



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias de la Salud
Departamento de Medicina

TESIS DOCTORAL

**Mecanismos de comunicación celular en
cartílago articular y su implicación en el
desarrollo de la artrosis**

Paula Carpintero-Fernández

A Coruña, 2015

*Directora: María D. Mayán Santos
Co-director: Francisco J. Blanco García*

La **Dra. María D. Mayán Santos**, Investigadora del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) y el **Dr. Francisco J. Blanco García**, Director Científico del INIBIC, Reumatólogo del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC – XXIAC), Profesor Asociado (USC) y Catedrático de Universidad Acreditado

CERTIFICAN QUE:

La presente memoria de tesis titulada “**Mecanismos de comunicación celular en cartílago articular y su implicación en el desarrollo de la artrosis**” presentada por Doña Paula Carpintero Fernández, para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el INIBIC, dentro del grupo de Reumatología y actualmente dentro del grupo denominado CELLCOM. La tesis ha sido revisada y está en disposición de ser presentada para optar al grado de Doctor

Para que así conste, firman el presente certificado en A Coruña, a 28 de Enero de 2015.

Fdo. Dra. María D. Mayán Santos
Directora de la Tesis

Fdo. Dr. Francisco J. Blanco García
Co-director de la Tesis

Fdo. Dña Paula Carpintero Fernández
Doctoranda

“ Incluso un camino sinuoso, difícil, nos puede conducir a la meta si no lo abandonamos hasta el final”

Paulo Coelho

A mis padres

Ha llegado el momento de escribir la parte más difícil, tantas cosas que decir y la eterna duda de cómo empezar. Han pasado tres años desde aquel agosto de 2011... Recuerdo que esperaba entre nervios y miedo el momento de entrar por primera vez al laboratorio. La curiosidad me mataba por dentro, ¿cómo serán mis compañeros? ¿seremos muchos? ... todo eran preguntas y todas, sin respuesta. Ahora, recuerdo aquel primer día con gran alegría era el día en que todo empezaba y hoy es el día en que se cierran tres años de ilusión, perseverancia, esfuerzo, trabajo diario, días buenos, días malos pero siempre teniendo en mente que “si tú quieres...puedes”.

En primer lugar me gustaría agradecerles a mis directores de tesis, Dra. María D. Mayán y Dr. Blanco la gran oportunidad que me han dado. Gracias por acogerme, por confiar en mí y por hacerme crecer día a día.

María, gracias por confiar en mí, por hacerme más fuerte, por transmitirme esa ilusión, por mostrarte siempre apasionada por tu trabajo. Contigo he aprendido que si hoy no sale no pasa nada; mañana saldrá y el resultado será mucho mejor. Durante todo este tiempo has estado ahí en los buenos y malos momentos, has sabido animarme y has conseguido que después de tres años haya abandonado *un poquito* el pesimismo que me caracteriza para ver el lado bueno de las cosas.

Gracias a todos mis compañeros del INIBIC por estar siempre dispuestos a ayudar y a contestar a las constantes y recurrentes preguntas que os he podido hacer durante todos estos años.

Mis *finas de barrio* qué os diré, que sois mis compañeras, pero sobre todo sois mis amigas. Amigas que me escuchan, a las que escucho y con las que he compartido grandes momentos. Noa, sabes que siempre serás *histupenda* para mí; gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme, por confiar en mí y por hacer que trabajar contigo sea una maravilla. Marta G., mi rubia, me encanta la ilusión que pones en todo lo que haces, siempre con una sonrisa y siempre dispuesta a ayudar a los demás. Marta V., eres trabajadora, perseverante y valiente; me apasiona tu entusiasmo frente a nuevos retos y estoy segura de que llegarás lejos. Raquel, ya ha pasado mucho tiempo desde aquellos intensos fines de semana de estudio, de todas las variantes de tu nombre que me he inventado, siempre has estado a mi lado y aunque parece que quizá ha llegado el momento de romper el tándem pili-mili estoy segura de que siempre encontraremos

tiempo para los amigos de siempre, los de verdad. A todas vosotras, gracias por hacer divertido un día de trabajo. Son muchas las horas, los minutos, los segundos que hemos pasados entre estas paredes; ha habido lloros, desesperación, frustración pero sobre todo muchos buenos momentos. Sois geniales y espero que todo esto llegue a vuestro pequeño – gran corazoncito.

Mis queridas biólogas, no me olvido de vosotras. Laura, Sonia, Yas, Lu, no nos vemos con frecuencia pero, gracias por hacer que cada *bio-meeting* sea como si no hubiese pasado el tiempo.

Nos conocemos desde hace muchos años, y aunque a día de hoy la distancia no permite que nos veamos demasiado, sabéis que esto también va para vosotras; Ana y Tere; graciñas.

Gracias a mi familia. A mis padres, sabéis que esta tesis es vuestra. Me lo habéis dado todo y yo siempre he intentado daros lo mejor de mí. Me siento orgullosa de vosotros, sois mi apoyo, mi respaldo y mi motivación. Gracias a mis abuelos, a los que están y también a los que se han ido, siempre me habéis cuidado y sé que siempre vais a estar haciéndolo. Merce, me has enseñado muchas cosas, desde siempre me has tratado como una hija, me has cuidado, has estado conmigo en los buenos y malos momentos, gracias a ti también.

Alejandro, eres mi ilusión y mi apoyo. Gracias a ti he sido fuerte en muchos momentos y gracias a ti he aprendido a caer y saber levantarme. Gracias por creer en mí, por estar siempre a mi lado, apoyar todas y cada una de mis decisiones y sobre todo gracias por cuidarme durante todos estos años.

RESUMEN

RESUMEN

Las uniones comunicantes (UC) consisten en canales formados por conexinas que permiten el contacto directo e intercambio de moléculas entre el citoplasma de dos células adyacentes. En el proyecto de tesis aquí presentado, utilizando microscopía óptica y electrónica de barrido demostramos que los condrocitos en cartílago articular forman proyecciones o brazos citoplasmáticos de hasta 200 μm de longitud que atraviesan la matriz extracelular y conectan físicamente con condrocitos distantes. Además, utilizando técnicas de electrofisiología hemos demostrado que estas células son capaces de formar canales voltaje dependientes formados exclusivamente por conexina 43 (Cx43). El cartílago de pacientes con artrosis, presenta niveles elevados de Cx43 y conexina 45 (Cx45) en las zonas dañadas del tejido. Estudios experimentales *in vitro*, siguieron que la Cx43 podría estar implicada en el cambio de fenotipo que sufren los condrocitos de pacientes con OA. En un segundo proyecto demostramos que el bloqueo de los receptores de membrana, que contienen ácido siálico en enlace α -2,3, utilizando la lectina MASL, protege al cartílago articular frente a la activación de procesos catabólicos responsables de la degradación del cartilago en pacientes con OA y otras patologías articulares que incluyen procesos inflamatorios.

RESUMO

As unión comunicantes (UC) son canles formados por conexinas que permiten o contacto directo e intercambio de moléculas entre o citoplasma de dúas células adxacentes. No proxecto de tese aquí presentado, utilizando microscopía óptica e electrónica de barrido demostramos que os condrocitos na cartilaxe articular forman proxeccións ou brazos citoplasmáticos de ata 200 μm de lonxitude que atravesan a matriz e conectan fisicamente con condrocitos distantes. Ademáis, utilizando técnicas de electrofisioloxía demostramos que as células son capaces de formar canles voltaxe – dependentes formados soamente por conexina 43 (Cx43). A cartilaxe de pacientes con artrose, presenta niveles elevados de Cx43 e conexina 45 (Cx45) nas zonas máis danadas do tecido e estudos experimentais in vitro, suxeriron que a Cx43 podería estar implicada no cambio de fenotipo que sofren os condrocitos de pacientes con artrose. Por outro lado, nun segundo proxecto, demostramos que o bloqueo dos receptores de membrana modificados con ácido siálico na posición α -2,3 utilizando a lectina MASL, protexe á cartilaxe articular fronte a activación dos procesos catabólicos que ocorren durante a artrose e outras patoloxías que afectan á articulación e que inclúen procesos inflamatorios.

ABSTRACT

Gap junctions (GJ) are membrane channels formed by connexins that allow the direct exchange of molecules, nutrients and other metabolites between contacting cells. In this Project, using optical and scanning electron microscopy, we have demonstrated that articular chondrocytes have long and thin cytoplasmic projections that travel through the extracellular matrix and physically connect with distant cells. Using electrophysiology assays, we have demonstrated that articular chondrocytes form functional voltage-dependent GJ formed by connexin 43 (Cx43). Cartilage from patients with osteoarthritis showed increased levels of Cx43 and Cx45 proteins in the damaged areas. Taken together, the results suggest that Cx43 may be implicated in the phenotypic changes suffered by the osteoarthritic chondrocytes. On the other hand, we have demonstrated that the quenching of α -2,3 sialylated receptors with the specific lectin MASL prevents the activation of the catabolic factors involved in cartilage degeneration.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN

1. Articulación sinovial	1
1.1. Cartílago articular	2
1.1.1. Componentes del cartílago articular: el condrocito	4
1.1.2. Componentes del cartílago articular: la matriz extracelular	5
1.1.2.a. Colágeno	6
1.1.2.b. Proteoglicanos	7
1.1.2.c. Otras glicoproteínas y proteínas no colágenas	7
1.2. Propiedades y función del cartílago articular	8
2. Artrosis	9
2.1. Procesos de degradación y degeneración del cartílago articular	9
2.1.1. Proteasas	11
2.1.2. Mediadores solubles de la inflamación	14
2.2. Tratamiento de la artrosis	16
3. Comunicación celular	19
3.1. Proteínas implicadas en comunicación celular	19
3.1.1. Conexinas y canales de conexinas	20
3.2. Glicosilación de proteínas	27
3.2.1. Lectinas	30

II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo celular de condrocitos y explantes de cartílago	35
1.1. Obtención de muestras de cartílago	35
1.2. Procesamiento del cartílago y cultivo de condrocitos	35
1.3. Obtención de explantes de cartílago	36
1.4. Línea celular T/C-28a2	36
1.5. A549	36

2. Técnicas histológicas y de microscopía	37
2.1. Técnicas histológicas, ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	37
2.1.1. Técnicas histológicas	38
2.1.2. Ensayos inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	39
2.2. Microscopía electrónica de barrido	40
3. Análisis de la expresión génica	41
4. Western-blot	44
4.1. SDS-PAGE	44
4.2. Transferencia a membrana e inmunodetección	44
5. Estudios de electrofisiología	45
5.1. <i>Dual voltaje-clamp</i>	45
5.2. Inyección del fluoróforo	46
5.3. Ensayo de electroporación	46
5.4. Ensayo de hemicanales	48
6. Sistema de co-cultivo en membrana porosa	48
6.1. Adherencia de células no marcadas a la membrana	51
6.2. Adherencia de células marcadas a la membrana	51
6.3. Lisado y filtrado	51
6.4. Transferencia e identificación de aminoácidos	52
6.5. Transferencia e identificación de proteínas	53
6.5.1. SDS-PAGE	53
6.5.2. Digestión de bandas y extracción de péptidos	54
6.5.3. Identificación de proteínas utilizando nanoLC-MALDI-TOF/TOF	55
7. Tratamiento de cultivos primarios y explantes de tejido con 1-Octanol 1mM	56
7.1. Citometría de flujo	57
8. Predicción e identificación de los sitios de glicosilación para la Cx43: predicción, purificación y estudio mediante espectrometría de masas	58
9. Métodos de detección de proteínas glicosiladas y con ácidos siálico en posición terminal y enlace α-2,3	59

9.1. Ensayos de toxicidad	60
9.1.1. Ensayo de viabilidad – ensayo colorimétrico MTT	60
9.1.2. Ensayo de adhesión celular	61
9.1.3. Ensayo de proliferación celular	61
9.2. Detección de especies reactivas de oxígeno	62
10. Estudio del efecto de MASL en un modelo in vivo utilizando ratones BALB/c	63
11. Análisis estadístico	63

IV. RESULTADOS

1. Comunicación celular en cartílago articular	65
1.1. Estudio de la presencia de proyecciones citoplasmáticas en condrocitos articulares procedentes de <i>Sus scrofa</i> y cartílago humano	65
1.2. Expresión de conexinas en condrocitos articulares	69
1.2.1. Estudio de la expresión y función de la conexina 43 en condrocitos y cartílago articular de donantes sanos	70
1.2.2. Estudio de la funcionalidad de canales de conexinas en condrocitos humanos	73
1.2.3. Estudio de la formación de hemicanales funcionales	76
1.3. Función metabólica de los canales de conexinas	78
1.3.1. Estudio del intercambio de nutrientes esenciales entre condrocitos articulares humanos: transferencia de glucosa	78
1.3.2. Estudio de la transferencia directa de aminoácidos, péptidos y proteínas: sistema de co-cultivo en membrana porosa y espectrometría de masas	80
1.3.2.a. Transferencia de aminoácidos entre condrocitos articulares humanos en co-cultivo	82
1.3.2.b. Transferencia directa de proteínas entre condrocitos en contacto	83
1.4. Expresión de la conexina 43 en cartílago articular de pacientes con artrosis	86
1.4.1. Estudio de la relación de la conexina 43 con proliferación celular en condrocitos	89
1.4.2. Estudio de los niveles de diferentes conexinas en tejido	90
1.5. Modificaciones postraduccionales de la conexina 43: glicosilación	92
2. Estudio del efecto de la lectina MASL en la estructura y función del cartílago adulto	93
2.1. Presencia de glicoproteínas sializadas en posición α -2,3 en cartílago articular	93

2.2. Efecto de MASL en viabilidad, adhesión y crecimiento celular de condrocitos primarios	97
2.3. Efecto de MASL sobre la producción de especies reactivas de oxígeno, mediadores proinflamatorios y enzimas que degradan la matriz	99
2.4. Efecto de MASL sobre la composición y estructura de explantes de cartílago en cultivo	102
2.5. Efecto de MASL utilizando como modelo de experimentación animal ratones BALC/c	104
V. DISCUSION	107
VI. CONCLUSIONES	117
VII. BIBLIOGRAFÍA	119
ANEXOS	132

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura de la articulación humana	2
Figura 2	Organización de los condrocitos y fibras de colágeno en el cartílago articular	4
Figura 3	Estructura del condrón	5
Figura 4	Componentes de la MEC	6
Figura 5	Desarrollo de la OA	9
Figura 6	Esquema del desequilibrio metabólico durante la OA	10
Figura 7	Estructura de las MMPs	13
Figura 8	Estructura de la ADAMTS	14
Figura 9	Esquema del tratamiento de la OA	17
Figura 10	Representación esquemática de la estructura de las conexinas y panexinas	20
Figura 11	Síntesis de Cxs y asociación con otras proteínas	21
Figura 12	Composición de las uniones comunicantes	22
Figura 13	Sitios de fosforilación del dominio C-terminal de la conexina 43	26
Figura 14	Representación esquemática de la reacción de glicosilación mediada por glicosiltransferasas	28
Figura 15	Unión de oligosacáridos a proteínas	29
Figura 16	Esquema de la cámara de 8 pocillos utilizada en el ensayo de electroporación	47
Figura 17	Esquema representativo del co-cultivo en membrana porosa	50
Figura 18	Condiciones experimentales para 1-Octanol 1 mM	57
Figura 19	Reacción de formación de cristales de formazán a partir de MTT	60
Figura 20	Ensayo de proliferación celular	62
Figura 21	Proyecciones citoplasmáticas en cartílago articular observadas mediante microscopía óptica	67
Figura 22	La MEB confirmó la presencia de brazos o extensiones del citoplasma de los condrocitos presentes en cartílago articular	68
Figura 23	Análisis de la expresión de conexinas en condrocitos articulares humanos en cultivo primario	70
Figura 24	Expresión de Cx43 en cultivo primario	71
Figura 25	Análisis de la expresión de Cx43 en explantes de cartílago articular humano	72
Figura 26	Estudio de la funcionalidad de los canales de conexinas en condrocitos humanos	74

Figura 27	Transferencia de oligonucleótidos entre condrocitos en contacto	75
Figura 28	Presencia de hemicanales en condrocitos primarios y la línea celular T/C-28a2	77
Figura 29	Transferencia directa de glucosa entre condrocitos contacto	80
Figura 30	Estudio de la transferencia directa de aminoácidos, péptidos y proteínas entre células en contacto	83
Figura 31	Niveles de localización de la Cx43 en cartílago de donantes con OA	88
Figura 32	Estudio de los niveles y localización de PCNA y Cx43 en cartílago adulto	90
Figura 33	Estudio de los niveles de Cx45, Cx32 y Cx46 en explantes de cartílago humano	92
Figura 34	Predicción de los sitios de glicosilación para la Cx43 utilizando GlycoEP	94
Figura 35	Estudio de la presencia de PDPN en cartílago de donantes sanos y pacientes con OA	96
Figura 36	Unión de la lectina MASL a glicoproteínas presentes en células en cultivo y explantes de tejido	97
Figura 37	Estudio del efecto de diferentes concentraciones de MASL en viabilidad, adhesión y crecimiento celular	98
Figura 38	Efecto de la oligomicina en cartílago y condrocitos en cultivo	100
Figura 39	Efecto del tratamiento con MASL en la producción de ROS y expresión de factores catabólicos	101
Figura 40	Estudio del efecto de MASL sobre cartílago articular en cultivo	103

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Principales mediadores solubles de la inflamación	15
Tabla 2	Funciones de las conexinas y sus canales en los diferentes órganos y tejidos	24
Tabla 3	Principales MPTs que sufren las proteínas	25
Tabla 4	Anticuerpo utilizados	40
Tabla 5	Secuencia de cebadores utilizada para el análisis de la expresión de conexinas	43
Tabla 6	Composición de los geles de poliacrilamida y composición de los tampones utilizados para la detección de proteínas	45
Tabla 7	Tinción de Plata y Comassie-Blue para geles de acrilamida/bisacrilamida 30%	54
Tabla 8	Identificación de proteínas marcadas	85

ACN	Acetonitrilo
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ADAMTS	del inglés " <i>a desintegrin and metalloproteinase with trombosporin motifs</i> "
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
AG	Aparato de Golgi
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
AmBi	Bicarbonato amónico
AR	Artritis reumatoide
ARNip	Ácido ribonucleico interferente pequeño
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Asn	Asparragina
BSA	Suero bovino de albúmina
CCND1	Ciclina D1
CHUAC	Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña
cm	Centímetro
cm²	Centímetro cuadrado
CO₂	Dioxido de carbono
Col2A	Colágeno dos A
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
Cx	Conexina
Cx26	Conexina 26
Cx32	Conexina 32
Cx40	Conexina 40
Cx43	Conexina 43
Cx43m	Conexina 43 mensajero
Cx43p	Conexina 43 primario
Cx45	Conexina 45
Cx46	Conexina 46
Cxs	Conexinas
DAPI	4',6'-diamino-2-fenilindol
DCF	2,7-diclorofluoresceína
DCFH-DA	2,7-diclorodihidrofluoresceína
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DTT	Ditriotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético

fmol	Fentomol
Formazán	(E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-1,3-difenilformazán
GAG	Glucosaminoglicano
gr	Gramo
h	Hora
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Ácido clorhídrico
HPRT1	Hipoxantina fosforribosiltransferasa 1
IAA	Yodacetamida
IHQ	Inmunohistoquímica
IL-1	Interleuquina 1
IL-11	Interleuquina 11
IL-17	Interleuquina 17
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
INIBIC	Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña
iNOS	Óxido nítrico sintasa
Inx	Inexinas
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolisacárido de <i>Salmonella sp.</i>
LY	Lucifer Yellow
M	Molar
MASL	<i>Maackia amurensis seed lectin</i>
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramo
miARN	micro ácido ribonucleico
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMP13	Metaloproteasa-13
MMP3	Metaloproteasa-3
MMPs	Metaloproteasas
MΩ	Megaohmio

MPTs	Modificaciones postraduccionales
MS	Espectrometría de masas
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
mV	Milivoltio
m/z	Relación masa/carga
NaCl	Cloruro sódico
nm	Nanometro
nmol	Nanomol
NP40	Nonil-fenoxipoliethoiletanol.
OA	Artrosis
p21	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina
PANX	Panexinas
PANX1	Panexina 1
PANX2	Panexina 2
PANX3	Panexina 3
PBS	Tampón fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDPN	Podoplanina
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonil
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
RE	Retículo endoplasmático
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa
s	Segundo
SAI	Servicio de Apoyo a la Investigación
SBF	Suero fetal bovino
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-	
PAGE	Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida
Ser	Serina
SFT	Suero fetal de ternera
SiaTs	Sialitransferasas
TFA	Trifluoroacético
Thr	Treonina

TIMP	Inhibidor de metaloproteasas
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano con ácido clorhídrico
UC	Uniones comunicantes
V	Voltios
αGA	Ácido alfa-glicirretínico
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrómetro

I. INTRODUCCIÓN

1. ARTICULACIÓN SINOVIAL

Los huesos, las articulaciones, los músculos, los tendones y los ligamentos entre otros tejidos forman el aparato locomotor que es el sistema encargado de facilitar el movimiento del cuerpo. Una articulación se define como el punto de unión de dos o más huesos y es la estructura encargada de que el movimiento del esqueleto se produzca sin dolor. En función del tipo de movimiento podemos distinguir articulaciones fibrosas (movilidad nula o escasa), articulaciones cartilaginosas (poco móviles o semimóviles) y articulaciones sinoviales (gran movilidad) ¹.

Las articulaciones denominadas sinoviales o diartrosis son las más frecuentes y están formadas por una cavidad articular que contiene líquido sinovial. Las superficies de los huesos en la articulación están recubiertas de cartílago articular. En toda articulación sinovial encontramos una serie de elementos característicos que se describen a continuación ^{2, 3,4} (**Figura 1**):

I. Elementos de protección que cierran la cavidad articular. Están formados por una capa interna que es sinovial y una externa que es fibrosa. La capa externa o fibrosa es rica en fibras de colágeno y elásticas; pero pobre en células. Se trata de una prolongación del periostio y está formada por los vasos y nervios articulares. La capa interna o sinovial es una membrana delgada y transparente que reviste toda la articulación y se encarga de secretar el líquido sinovial, manteniendo de esta manera la lubricación de la articulación. La membrana sinovial presenta una capa celular íntima que descansa sobre una lámina subintimal de tejido conjuntivo vascularizado en continuidad con la membrana fibrosa. La capa íntima es fina y translúcida. En ella se encuentran las células denominadas sinoviocitos (tipo A y tipo B). El sinoviocito tipo A es el tipo más abundante en adultos y son similares a los macrófagos; su principal función es la fagocitosis. El de tipo B secreta ácido hialurónico, queratán y condroitín sulfato. La denominada lámina subintimal está formada por tejido conjuntivo con fibras elásticas y una cantidad variable de tejido adiposo; es rica en células histiocitarias y muy vascularizada.

II. Elementos de amortiguación de presiones. El cartílago articular y el líquido sinovial son los elementos encargados de amortiguar las presiones y de reducir las fuerzas que ejercen presión sobre la articulación. El cartílago articular reviste las superficies articulares, mientras que el líquido sinovial es el líquido transparente y viscoso formado por un filtrado del plasma y muy rico en mucina. Su función principal es la de lubricar la articulación y nutrir al cartílago.

III. Elementos de mantenimiento o estabilidad articular; son los ligamentos y tendones los que forman estas estructuras aumentando la estabilidad articular.

IV. El cartílago articular, el líquido sinovial, el menisco y el rodete forman los **elementos de contacto y deslizamiento** que favorecen el deslizamiento de las superficies articulares. El cartílago articular debido a su superficie lisa, reduce el coeficiente de fricción articular; mientras que el rodete, menisco y disco favorecen el deslizamiento.

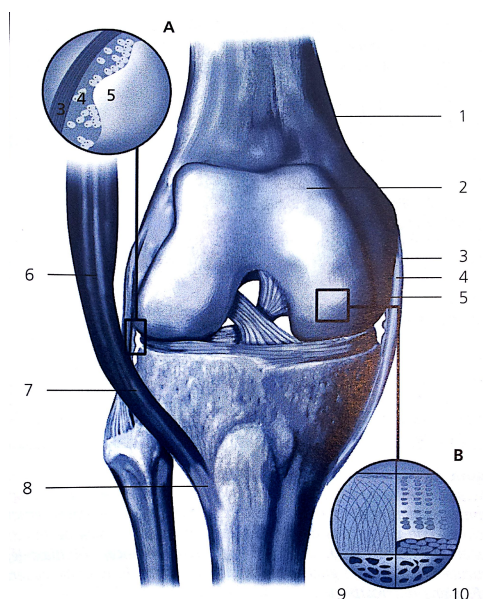


Figura 1. Estructura de la articulación sinovial humana. En la figura se distinguen todos los componentes de la articulación sinovial. 1. Ligamento. 2. Cartílago articular. 3. Membrana fibrosa de la cápsula. 4. Membrana sinovial. 5. Cavidad articular. 6. Músculo esquelético. 7. Tendón. 8. Entesis. A) Detalle de la cápsula articular (membrana fibrosa y sinovial) con sinoviocitos. B) Detalle del cartílago articular con la orientación de las fibras de colágeno (9) disposición de los condrocitos en la matriz extracelular (10). Imagen obtenida de: *De Toro, F.J. Manual SER de las enfermedades reumáticas. 2004*

1.1. Cartílago articular

El cuerpo humano está formado por 3 tipos de cartílago: el articular o hialino, el fibrocartílago y el elástico. El cartílago articular es el tejido que recubre las superficies de los huesos en las articulaciones sinoviales y presenta un aspecto blanquecino brillante con un grosor que oscila entre 1 y 5 mm. Se trata de un tejido conectivo especializado y en adultos es un tejido avascular, aneural y alinfático formado por células denominadas condrocitos inmersos en una densa matriz extracelular (MEC). La composición proteica y estructura de la

MEC son las responsables de las propiedades físicas del cartílago. Los condrocitos son las células encargadas de sintetizar los componentes de la MEC y constituyen sólo del 1 al 5% del volumen total del cartílago ⁵.

El cartílago articular se organiza en varias zonas según su estructura y disposición celular (**Figura 2**). En la capa superficial, los condrocitos son de pequeño tamaño y de forma alargada. Las fibras de colágeno son compactas y adoptan una orientación horizontal, lo que protege al cartílago de la abrasión. La capa intermedia representa del 40 al 60% del grosor total del cartílago. Se caracteriza por presentar condrocitos esféricos dispuestos solos o en grupos y distribuidos de manera aleatoria en la MEC. En la capa profunda los condrocitos tienen forma más elíptica y se disponen en columnas de 2 a 6 células orientados perpendicularmente a la superficie. Las fibras de colágeno se encuentran más separadas, tienen mayor diámetro y se disponen alineadas de manera vertical. Por último, se encuentra la capa de cartílago calcificado en la zona mas cercana al hueso, donde los condrocitos están más esparcidos y en menor número. Cabe destacar que entre la zona profunda y la calcificada se encuentra el llamado frente de calcificación o *tide mark*, que se perfila como una línea cuando se tiñe con técnicas histológicas habituales ⁶.

Las propiedades mecánicas del cartílago articular derivan de la especial composición de la MEC, formada principalmente por colágeno tipo II, proteoglicanos, gran cantidad de glicoproteínas y agua entre otros componentes. Debido a la composición, distribución de las fibras que forman la MEC y al bajo número celular, se postula que la capacidad de reparación del cartílago articular, así como el recambio de componentes de la MEC, es limitado.

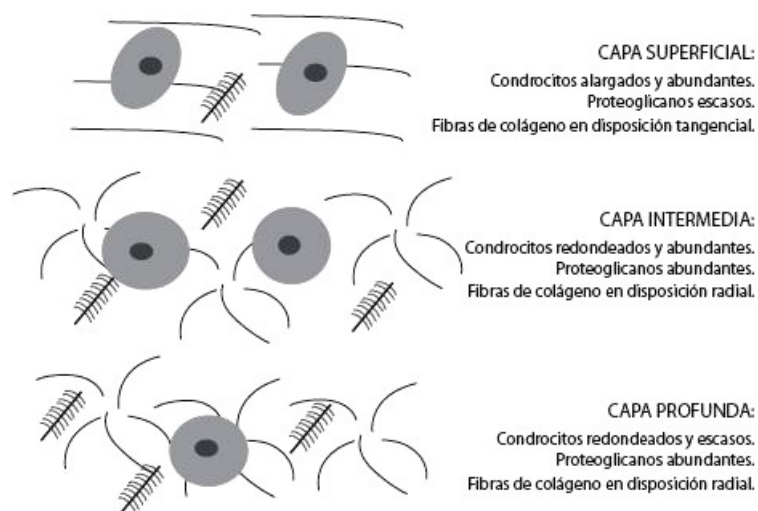


Figura 2. Organización de los condrocitos y fibras de colágeno en el cartílago. En la imagen se representan los condrocitos y las fibras de colágeno y su distribución en las diferentes capas del cartílago. Imagen obtenida y adaptada de : <http://www.scielo.org.co/img/revistas/iat/v24n2/v24n2a6f2.jpg>

El cartílago articular es un tejido afectado por diferentes patologías degenerativas como la artrosis u osteoartritis (OA), o patologías asociadas con procesos autoinmunes y/o inflamatorios como, por ejemplo, la artritis reumatoide (AR). Éstas y otras situaciones patológicas desencadenan en un desequilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos, siendo los catabólicos predominantes, lo que da lugar a la síntesis de proteasas y otros componentes que asociado a las altas presiones que sufre las articulaciones producen pérdida de la integridad del cartílago articular y la funcionalidad de la articulación ⁷.

1.1.1. Componentes del cartílago articular: el condrocito

La unidad funcional del cartílago es el condrón, que está formado por el condrocito, la laguna (lugar que ocupa el condrocito en la MEC) y la matriz pericelular rica en proteoglicanos y colágeno tipo IV, que facilita la adhesión del condrocito a la matriz ⁵ (**Figura 3**). La matriz pericelular ocupa de 1 a 3 mm alrededor de las lagunas del condrocito y su función principal es la protección del condrocito frente a las tensiones mecánicas. Rodeando al condrón aparecen una gran cantidad de fibras de colágeno, principalmente colágeno tipo II; sin embargo, se ha observado la presencia de otros tipos de colágenos como por ejemplo el colágeno tipo VI, IX, XI, XII y XIV.

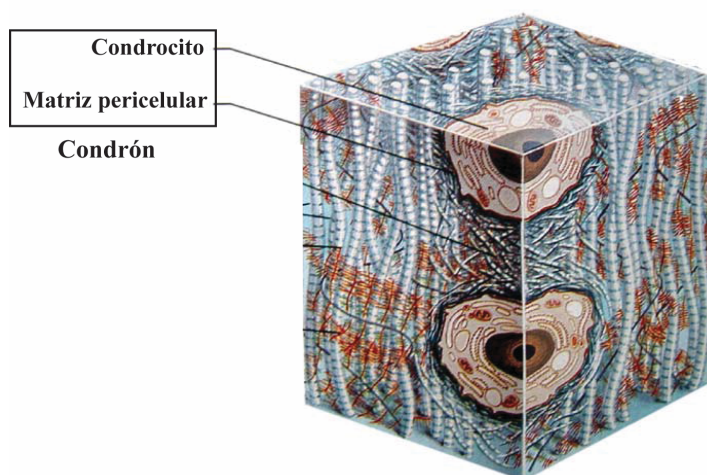


Figura 3. Estructura del condón. En la figura se observa la unidad funcional del cartílago (condón), formado por el condrocito, la laguna y la matriz pericelular que lo rodea. Imagen obtenida y adaptada de: http://www.traumatologiaveterinaria.com/articulos/docs/cartilago_articular.pdf

La función celular del condrocito está determinada por los cambios sufridos en la composición de la MEC, variaciones en la presión de la membrana celular, la edad y determinados factores de crecimiento, entre otros. La división celular no es frecuente en cartílago de adultos; sin embargo, los condrocitos mantienen una actividad anabólica y proliferativa elevada en fases de crecimiento, como por ejemplo en la placa epifisaria⁸. Los diferentes estados de proliferación, diferenciación e hipertrofia de los condrocitos culminan en la calcificación de la MEC y consecuente formación de tejido óseo durante la fase de crecimiento⁹.

1.1.2. Componentes del cartílago articular: la matriz extracelular

La MEC representa del 95 al 98% del volumen total del cartílago. Está formada por agua, colágeno tipo II, proteoglicanos y multitud de proteínas entre otros componentes (**Figura 4**). El agua constituye la fracción líquida de la matriz, mientras que el resto de moléculas forman un armazón sólido que proporciona al cartílago sus propiedades biomecánicas. El agua retenida en el tejido es crucial para la deformación del cartílago en respuesta al estrés; se distribuye de manera desigual: en la capa superficial representa el 80% mientras que en la profunda solamente el 60% es agua. La MEC está organizada en 3 regiones que difieren en la composición de moléculas: (i) La pericelular es rica en proteoglicanos y proteínas no colágenas. (ii) La territorial que se dispone a modo de cápsula alrededor del condón y

finalmente, (iii) la interterritorial que está formada por fibras de colágeno, siendo la capa que ocupa un mayor volumen ¹⁰.

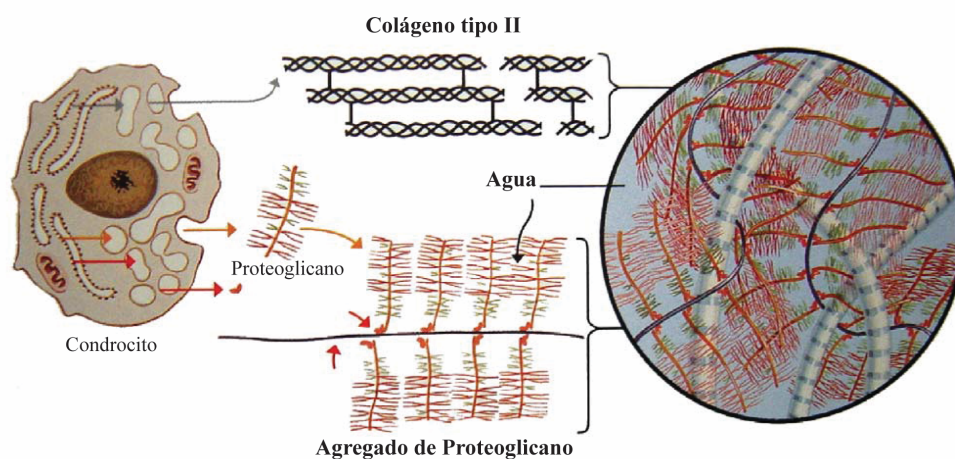


Figura 4. Componentes de la MEC. En la figura se representan alguno de los elementos que forman parte de la MEC; colágeno tipo II, proteoglicanos y agua. Además a la izquierda puede observarse el único tipo celular descrito: el condrocito. Imagen obtenida y adaptada de: http://www.traumatologiaveterinaria.com/articulos/docs/cartilago_articular.pdf

1.1.2.a. Colágeno

En el cartilago articular el 90-95% del colágeno que encontramos es colágeno tipo II. Este tipo de colágeno podemos encontrarlo también en otros tejidos como en la córnea embrionaria o en el humor vítreo del ojo. Es sintetizado por los condrocitos y liberado al espacio extracelular como procolágeno, sobre él actúan las enzimas proteolíticas para finalmente ser incorporado en forma de fibra de colágeno a la matriz. El colágeno de tipo II se organiza según un entramado tridimensional especial a modo de malla, orientado para descargar las fuerzas de tracción y proporcionar así resistencia a la tensión ⁵. El cartilago articular es el tejido que mas colágeno tipo II contiene ¹¹.

A pesar de que el colágeno tipo II es el más abundante, podemos encontrar colágeno tipo VI, IX, XI, XII y XIV, aunque son componentes minoritarios. Asociado al colágeno tipo II suele aparecer el colágeno tipo IX, cuya función es la de dirigir la disposición de las fibrillas de colágeno tipo II, por lo que contribuye en la estabilidad y resistencia que presenta el cartilago. El colágeno tipo VI es característico de los estadios menos avanzados de la OA, mientras que el colágeno tipo X aparece durante el proceso de osificación osteocondral y por lo tanto su

presencia se asocia a procesos de calcificación del cartílago. Además, como ya se ha comentado en el apartado anterior, la MEC contiene colágeno tipo IV que forma parte de la matriz pericelular que rodea a los condrocitos ¹².

1.1.2.b. Proteoglicanos

Los proteoglicanos representan del 10 al 15% del volumen total de la matriz. Participan en la resistencia a la compresión que presenta el cartílago articular. Además, debido a su estructura y carga negativa, se caracterizan por retener gran cantidad de agua en el tejido ¹³. Son sintetizados por los condrocitos y están formados por proteínas a las que se unen moléculas de glucosaminoglucanos (GAG). Los GAG más importantes son el condroitín-sulfato (condroitín-4-sulfato y/o condroitín-6-sulfato); queratán-sulfato y dermatán-sulfato. La mayoría de los proteoglicanos consisten en agregados de moléculas donde el núcleo central es una molécula de ácido hialurónico al que se unen otras moléculas de menor tamaño. El ácido hialurónico es sintetizado por los condrocitos y tiene la función de enlazar entre sí a los proteoglicanos a través de un enlace proteico formando proteoglicanos de gran tamaño. Los agregados formados de esta manera van a ocupar los espacios entre las redes de fibrillas de colágeno ¹⁴.

Cuando se produce un daño en el tejido, la respuesta primaria de los condrocitos es aumentar la síntesis de proteoglicanos de manera significativa. Sin embargo, esta respuesta no siempre contribuye a la reparación final del tejido ⁵.

1.1.2.c. Otras glicoproteínas y proteínas no colágenas

Las glicoproteínas que forman parte de la MEC del cartílago tienen la función de servir como medio de unión entre la MEC y los condrocitos. En general consisten en proteínas que tienen asociados oligosacáridos o monosacáridos y participan tanto en la estructura del tejido como en la respuesta de los condrocitos a diferentes estímulos. Entre las proteínas glicosiladas se incluye a receptores de membrana que contribuyen a la organización de la MEC, a la interacción celular y a la respuesta del tejido en artropatías inflamatorias.

Entre las proteínas cruciales para la función normal del condrocito y del cartílago se destaca: (i) la integrina, implicada en migración, proliferación y diferenciación de los condrocitos, (ii) la ancorina, glicoproteína que participa en el anclaje de los condrocitos a las fibras de colágeno de la matriz y actúa como mecanoreceptor, (iii) la fibronectina, (iv) la condronectina, (v) la tenascina o (vi) la osteopontina ¹⁴.

1.2. Propiedades y función del cartílago articular

La función principal del cartílago articular es proporcionar una superficie lisa y de bajo coeficiente de fricción que permita el movimiento de la articulación sin que se produzca dolor^{15 16}. Los movimientos que puede realizar la articulación se componen de movimientos de giro y deslizamiento. El tipo de movimiento varía en función del tipo de articulación. Así pues, podemos tener movimiento de deslizamiento, de rotación o combinados¹⁷.

Para facilitar el movimiento, las superficies se protegen con una capa de lubricina y ácido hialurónico que se adhiere al cartílago, lo que permite que el movimiento se consiga gracias al deslizamiento de las superficies articulares. La distribución de la capa de lubricación varía en función del tipo de movimiento que se trate. Así pues, podemos tener una lubricación por fluido, que permite soportar cargas elevadas durante periodos cortos de tiempo; una lubricación elastohidrodinámica, que se produce cuando las superficies articulares sufren cierta deformación por lo que el área de contacto incrementa y como consecuencia la capa de lubricante aumenta; la autolubricación que consiste en la capacidad del propio cartílago para captar y soltar líquido, de esta manera cuando se produce una carga el cartílago deja salir el líquido protegiendo así su estructura frente a la presión. Por último, existe la lubricación de refuerzo, que consiste en infiltraciones del líquido sinovial hacia el cartílago articular; las macromoléculas del líquido sinovial quedan retenidas entre las superficies articulares.

2. ARTROSIS

La artrosis (OA) es la enfermedad reumática más frecuente. Afecta a alrededor del 12% de la población occidental ¹⁸. Estudios de prevalencia publicados en 2014, reflejaron que todos los individuos mayores de 65 presentan evidencias de esta patología. Se estima que el 9,6% de los hombres y el 18% de las mujeres mayores de 60 años tienen OA sintomática. Además, supone un gasto de aproximadamente 2000 dólares/año ¹⁹. En el ser humano las manos, rodillas, cadera y columna vertebral son las articulaciones potenciales y más frecuentes en el desarrollo de la OA. Los síntomas y signos de la enfermedad generalmente se acompañan de pérdida de función de la articulación, rigidez, pérdida de movilidad y dolor en las fases más avanzadas. La OA no afecta exclusivamente al cartílago articular, afecta de alguna forma a todos los elementos de la articulación sinovial entre los que se incluye cartílago articular, membrana sinovial y hueso subcondral ^{20,21}.

2.1. Procesos de degradación y degeneración del cartílago articular

La OA es una enfermedad degenerativa caracterizada por la pérdida gradual del cartílago articular. La edad, el sexo, la obesidad y la predisposición genética han sido propuestos como los factores de riesgo más comunes en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, su etiología todavía es desconocida ²²⁻²⁴. A pesar de su posible origen multifactorial, los signos presentan características comunes que derivan en dolor, deformación y pérdida de función de la articulación ¹⁶ (**Figura 5**).

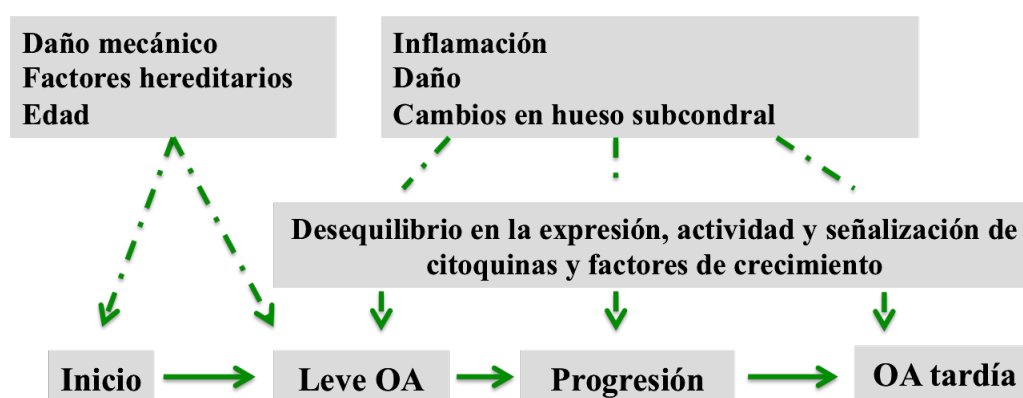


Figura 5. Desarrollo de la OA. Esquema de los eventos que ocurren en el inicio de la OA y su progresión hacia un estadio avanzado. Los potenciales factores de riesgo están representados en las cajas de la parte superior de la imagen. Imagen obtenida y adaptada de: Goldring, M. et al. *Osteoarthritis*. 2007.

La degeneración del cartílago articular que se produce en los pacientes con OA ocurre en dos fases: (i) una fase biosintética, donde las propias células del cartílago intentan reparar el daño de la MEC y (ii) una fase de degradación, donde enzimas producidas por los condrocitos degradan los diferentes componentes proteicos de la MEC y como consecuencia los procesos de degeneración tisular se aceleran²⁵⁻²⁸.

En condiciones no patológicas, la homeostasis del tejido se mantiene gracias a un equilibrio entre los procesos de síntesis y degradación de los componentes de la MEC. Cuando este equilibrio dinámico se rompe, por ejemplo, bajo presión continuada, daño o en situación de inflamación, prevalecen los procesos catabólicos (**Figura 6**) y se activan rutas de señalización que dan lugar a la destrucción del cartílago articular²⁹. En términos generales, el programa catabólico se caracteriza por la secreción de proteasas, la supresión de la síntesis de los componentes de la MEC y la reducción en el número de condrocitos³⁰.

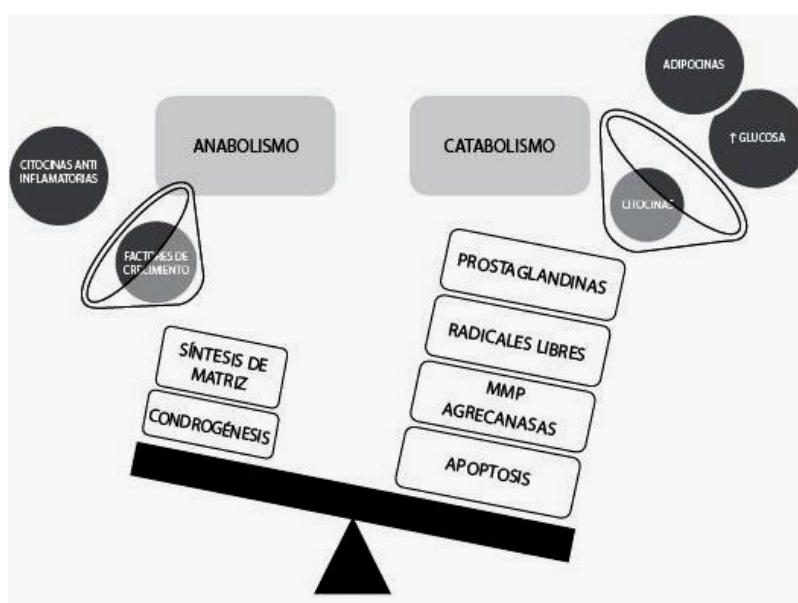


Figura 6. Esquema general del desequilibrio en el metabolismo de la MEC durante el proceso de la OA y los mecanismos implicados que ocasionan el aumento del catabolismo. Imagen obtenida y adaptada de: <http://www.scielo.org.co/img/revistas/iat/v24n2/v24n2a6f4.jpg>

Existe controversia en el campo de la artrosis en cuanto a si factores asociados a procesos inflamatorios son los responsables primarios de la aparición de la OA. Aunque la OA está considerada como una artropatía no inflamatoria debido a la ausencia de neutrófilos en el líquido sinovial, cabe destacar que citoquinas inflamatorias y otros mediadores pro-inflamatorios son producidos por las células de la membrana sinovial y por los condrocitos

durante el desarrollo de la enfermedad. De hecho, factores inflamatorios han sido detectados en el líquido sinovial de pacientes con OA ³¹⁻³³.

2.1.1. Proteasas

Desde el punto de vista catabólico, el elemento más importante en la degradación del cartílago articular es la síntesis y actividad de diferentes tipos de proteasas. Las proteasas más estudiadas y relacionadas con el desarrollo de la OA son las metaloproteasas (MMPs) y las proteasas ADAMTS ^{34,35}. La familia de las MMPs consiste en al menos 25 miembros que pueden ser zinc o calcio dependientes. Se clasifican en 5 grupos diferentes de acuerdo con la especificidad de sustrato, estructura primaria y localización celular ³⁶:

- I. Colagenasas.** Están representadas por la colagenasa-1 (MMP-1), colagenasa-2 (MMP-8) y la colagenasa-3 (MMP-13). Su función principal consiste en la degradación de las fibras de colágeno pudiendo degradar el colágeno tipo I, tipo II y el tipo III.
- II. Gelatinasas.** Gelatinasa-A (MMP-2) y la gelatinasa-B (MMP-9). La MMP-2 es característica de células mesenquimales, mientras que la MMP-9 se encuentra asociada a macrófagos, así como también, se expresa en células de tejido conectivo o tumorales. Junto con las colagenasas contribuyen a la destrucción de las fibras de colágeno (I, II, III, IV, V, VII, X, XI y XIV) además, son capaces de degradar otros componentes de la MEC como la fibronectina.
- III. Estromelisinias.** La estromelisinina-1 (MMP-3) y la estromelisinina-2 (MMP-10), son las que presentan un rango más amplio de actuación y pueden degradar prácticamente a cualquier componente de la MEC (gelatina, fibronectina, laminina, agregano). Su expresión está asociada a la presencia de daño en el tejido, ya que su presencia no ha sido descrita en tejido sano.
- IV. Matrilisinias.** Se caracterizan por la pérdida del dominio COOH-terminal característico del resto de MMPs. La matrilisinina-1 (MMP-7) se encuentra en gran cantidad de tejidos tanto sanos como dañados, mientras que la matrilisinina-2 (MMP-26) sólo ha sido descrita en útero, placenta y células del endometrio. La MMP-7 es la encargada de la degradación de fibronectina, laminina, colágeno IV y gelatina, mientras que la MMP-26 degrada fibrinógeno, fibronectina y gelatina.

- V. **MT-MMPs.** Como se ejemplifica en la **figura 7** se trata de MMPs que además de los dominios habituales presentan un dominio transmembrana que contribuye al anclaje de la MMPs a la membrana celular y es importante en procesos de señalización celular. No se ha descrito ninguna MT-MMPs asociada al proceso de degeneración del cartílago articular. Son las responsables de la degradación de gelatina, fibronectina, laminina y gelatina.

La actividad enzimática de estos mediadores está controlada por inhibidores específicos denominados inhibidores de tejido de las MMPs (TIMP). En el cartílago de pacientes con OA se ha descrito que existe un desequilibrio en los niveles de TIMP y las MMPs produciéndose una deficiencia relativa de estos inhibidores ³⁵.

La función principal de las MMPs es degradar los componentes de la MEC. Actúan tanto en procesos de reparación como de degeneración de los tejidos. La estructura básica de estas enzimas consiste en una serie de dominios: un péptido señal que dirige a las MMPs hacia la membrana, un propéptido y un dominio catalítico carboxiterminal (**Figura 7**). La actividad proteolítica de las MMPs se regula a tres niveles: a nivel de regulación de la transcripción génica, activación del proenzima e inactivación por TIMP. Estos mecanismos operan coordinadamente para asegurar que la expresión y actividad de las MMPs se ajuste a aquellos sitios y condiciones en lo que se necesita su actividad ³⁷.

Las collagenasas y estromelisinan son las más importantes en el proceso artrósico ya que son las responsables de la degradación de las fibras de colágeno y los proteoglicanos que componen la MEC. Además la MMP-3 participa en la activación de las collagenasas latentes. Las collagenasas responsables de la degradación de las fibras de colágeno tipo II son la MMP-1, la MMP-8 y la MMP-13. La expresión de la MMP-13 en el cartílago artrósico y su capacidad para degradar colágeno tipo II, la convierten en una de las enzimas más importantes en la degradación del cartílago articular en pacientes con OA. Además en un estudio se ha demostrado que bloqueando la actividad de la MMP-8 y la MMP-13, la degradación del colágeno tipo II se para, y además sugiere que la MMP-1 no interviene en este proceso. ³⁸⁻⁴²

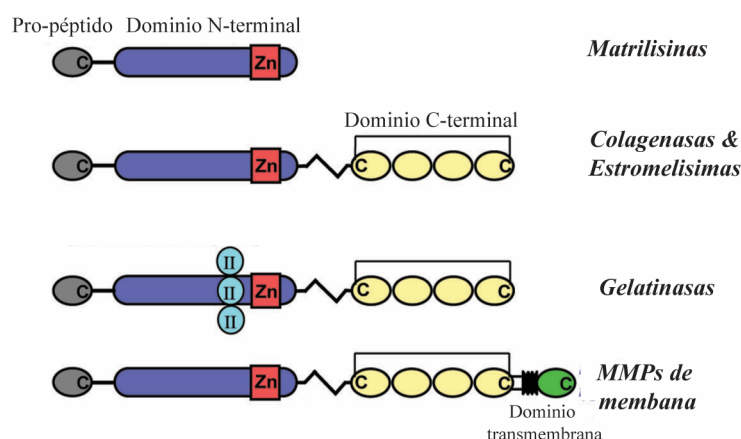


Figura 7. Estructura de las MMPs. En la figura se muestran los dominios mínimos de las MMPs. Las MMPs consisten en un propéptido (gris) que mantiene a las enzimas en estado inactivo; un dominio catalítico ⁴³ que contienen el sitio activo y, el sitio catalítico de Zn (rojo) y un dominio COOH-terminal (amarillo), a excepción de las matrilisinas que pierden este dominio. Las MMPs de membrana contienen además un dominio transmembrana (negro) y una cola citoplasmática (verde) en el dominio COOH-terminal que ayuda al anclaje de la enzima a la membrana celular. Imagen obtenida y adaptada de: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/ar572.pdf>

Las ADAMTS (por su nombre en inglés *a desintegrin and metalloproteinase with thrombosporin motifs*) son otro tipo de enzimas implicadas en procesos de degradación del cartílago articular durante la OA. Se conocen hasta 19 tipos de ADAMTS en humanos ⁴⁴. Las ADAMTS son enzimas extracelulares que presentan varios dominios (**Figura 8**) y que tienen la capacidad de unirse a las proteínas que forman la MEC ^{45,46}. Entre las funciones que desempeñan podemos destacar (i) el procesamiento de colágeno, (ii) degradación de componentes de la MEC como el agregano, (iii) inhibición de la angiogénesis, y (iv) participan en la homeostasis de la coagulación sanguínea actuando como enzima de corte del factor de von Willebrand. Además, intervienen en procesos de organogénesis, inflamación y fertilidad. Recientemente, se ha visto que algunos de los genes que dan lugar a las ADAMTS están alterados durante el proceso artrósico y en diferentes tipos de cáncer ⁴⁷. ADAMTS-2, ADAMTS-3 y ADAMTS-14, intervienen en la síntesis de colágeno al ser las responsables del paso de la molécula de procolágeno a colágeno. Este proceso tiene lugar cuando el dominio N-terminal del procolágeno es cortado por ADAMTS dando lugar a colágeno. ADAMTS-2 actúa sobre el procolágeno tipo I, II y III mientras que ADAMTS-3 y ADAMTS-14 sólo han sido relacionadas con el procesamiento del procolágeno tipo I y II ⁴⁸⁻⁵¹. Las agreganasas, (ADAMTS-1, ADAMTS-4, ADAMTS-5, ADAMTS-9 y DAMTS-15) son las responsables de la degradación de las moléculas de agregano que forman la MEC del cartílago articular. El agregano es el proteoglicano más abundante en el cartílago siendo el responsable de la resistencia del tejido a la compresión ⁵². Fragmentos de agregano generados por las

agrecanasas fueron identificados en explantes de condrocitos bovinos tratados con IL-1⁵³. Además, ADAMTS-4 y ADAMTS-5 son capaces de degradar proteoglicanos de condroitín sulfato como el brevican que se expresa fundamentalmente en el sistema nervioso central⁵⁴, o el versicano, presente en los vasos sanguíneos.

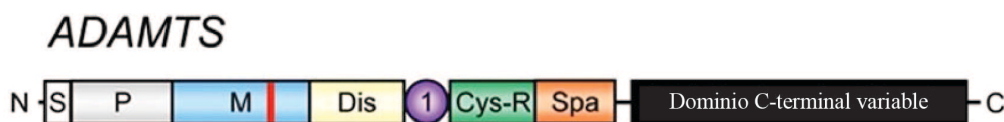


Figura 8. Estructura de las ADAMTS. S (propéptido); P (metaloproteasas); M (dominio de unión a zinc en rojo); Dis (dominio desintegrina); TSP1 (primer dominio de trombosporina tipo 1); Cys-R (dominio rico en cisteína), Spa (dominio espaciador); dominio C-terminal variable. Imagen obtenida y adaptada de: <http://www.mjhid.org/index.php/mjh/article/viewFile/421/626/2844>

Se ha sugerido que la expresión de estas enzimas (MMPs y ADAMTS) en el proceso artrósico ocurriría en una secuencia de acontecimientos: la degradación de la MEC durante la OA comenzaría como consecuencia de la activación de MMP-3 y ADAMTS-5, seguido de un incremento en los niveles de actividad de las colagenasas, concretamente de MMP-13, que es capaz de degradar las fibras de colágeno tipo II de manera eficiente¹⁶.

2.1.2. Mediadores solubles de la inflamación

Los condrocitos presentan gran cantidad de receptores que interaccionan con los componentes de la MEC, muchos de los cuales son los responsables de su estimulación mecánica. La activación de alguno de estos receptores activa la producción de enzimas que degradan la MEC, así como también la producción de mediadores de la inflamación al activar diferentes rutas de señalización¹⁶. Alguno de los mediadores de la inflamación sintetizados y liberados por los condrocitos y otros tipos celulares presentes en la articulación se muestran en la **tabla 1**. Dentro de éstos se incluye la ciclooxigenasa 2 (COX-2), prostaglandinas, fosfolipasas solubles y enzimas de producción de óxido nítrico⁵⁵.

Principales mediadores de la inflamación	
Citoquinas	
Proteasas plasmáticas	Complemento Quininas Coagulación-fibrinólisis
Eicosanoides	Prostaglandinas Leucotrienos
Aminas vasoactivas	Histamina Serotonina
Factor activador de plaquetas	
Óxido nítrico	
Proteasas lisosómicas	Aspartano proteasas Cisteína proteasas Serina proteasas Metaloproteasas

Tabla 1. Principales mediadores solubles de la inflamación. En la tabla se ejemplifican los diferentes tipos de mediadores inflamatorios subdivididos por grupos (columna izquierda) y las moléculas que forman parte de cada grupo (columna derecha). Imagen obtenida y adaptada de: *Capítulo 6. Manuel SER de las Enfermedades Reumáticas. 2004*

Un amplio rango de citoquinas (pro y anti-inflamatorias), antagonistas y factores de crecimiento desencadenan los procesos fisiopatológicos que ocurren durante la OA. Las citoquinas proinflamatorias han sido propuestas como esenciales en el desarrollo de la enfermedad, concretamente la interleuquina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). En la OA se ha observado que existen niveles elevados de otro tipo de citoquinas como la IL-6, IL-8, IL-17 o IL-11, por lo que deben de ser consideradas también como factores importantes en la patogénesis de la enfermedad ^{56,57}. Las citoquinas proinflamatorias como la IL-1 y el TNF α producen óxido nítrico a través de un incremento en la forma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS) ³⁵. El óxido nítrico es capaz de actuar de forma autocrina y producir efectos catabólicos y antianabólicos.

Los eicosanoides son mediadores lipídicos formados a partir de ácidos grasos de la membrana celular, principalmente ácido araquidónico. En el caso de la OA, los más interesantes son las prostaglandinas y los leucotrienos. Para que se sinteticen, es necesario que el ácido araquidónico se encuentre disponible y se libere para poder ser metabolizado. El ácido araquidónico es metabolizado por enzimas denominadas ciclooxigenasas (COX). Existen dos isoformas de COX en mamíferos, COX-1 y COX-2 que comparte un 60% de homología; sin

embargo, difieren en el patrón de expresión así como también en los genes que las codifican. COX-1 es constitutiva y es la responsable de la función fisiológica de las prostaglandinas. La expresión de COX-2 está inducida por mediadores de la inflamación, factores de crecimiento o toxinas bacterianas ⁵⁸. Resultados publicados por diferentes grupos de investigación sugieren que los condrocitos de pacientes con OA sobreexpresan COX-2 ^{59,60}.

El mantenimiento de la estructura del cartílago durante toda la vida requiere un remodelado continuo de las moléculas de la MEC en respuesta al uso y función de la articulación. Los condrocitos modifican la matriz del cartílago como respuesta a multitud de señales mecánicas y bioquímicas. Para ello, disponen en su membrana de receptores, así como también de un amplio sistema de transporte iónico de membrana. Debido a las características del tejido, se postula que el cartílago articular tiene una baja capacidad de regeneración que, además disminuye con la edad. Sin embargo, utilizando diferentes modelos animales han sido identificados posibles mecanismos de reparación. Por ejemplo, el denominado proceso de reparación osteocondral que se llevaría a cabo gracias a la liberación de células mesenquimales desde el hueso subcondral ²⁹. Por otro lado, existe el llamado tejido de reparación identificado en las zonas mas superficiales del cartílago en contacto con el líquido sinovial. Este tejido *de novo* presenta características especiales ya que los condrocitos tienden a agruparse y aunque aumenta el contenido en GAG y colágeno se cree que no llega a formar cartílago articular al menos en pacientes con OA ^{61,62}.

2.2. Tratamiento de la artrosis

La etiología de la OA es desconocida, por este motivo no existe tratamiento disponible para combatirla ⁶³. El tratamiento de la OA es paliativo, dirigido a reducir el dolor, la inflamación y mejorar la calidad de vida del paciente ^{18,64} (**Figura 9**). La identificación de los mecanismos implicados en la degeneración del cartílago que ocurre en pacientes con OA ayudará a identificar nuevas dianas terapéuticas y por lo tanto a desarrollar nuevas terapias eficaces tanto en la prevención como para el tratamiento de la enfermedad.

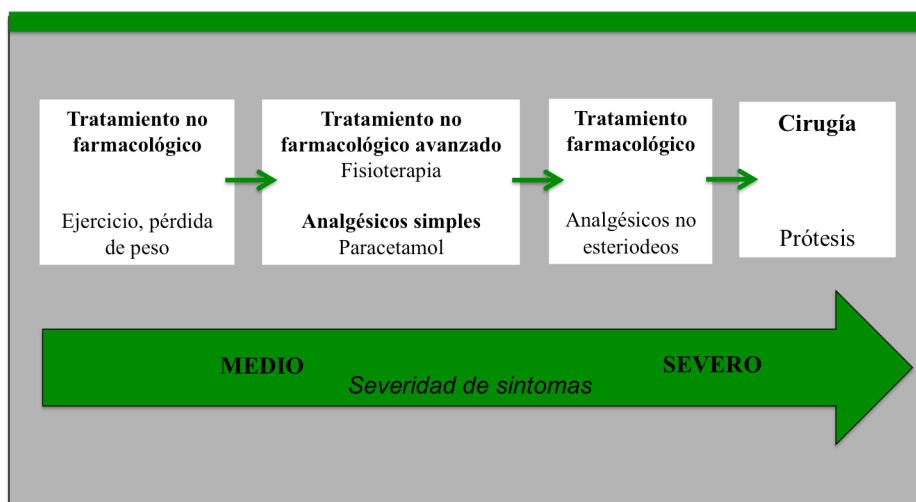


Figura 9. Esquema del tratamiento de la OA. Este es un ejemplo de los distintos tratamientos por los que pasa un paciente con OA. Imagen obtenida y adaptada de: Hunter, D. J. et al. *Osteoarthritis*. 2006.

Los tratamientos no farmacológicos se fundamentan en la educación del paciente dando consejos sencillos sobre la economía articular. Se suelen enseñar medidas encaminadas a reducir la carga que soportan las articulaciones. Dado que muchos de los pacientes que padecen OA presentan sobrepeso, se ha demostrado que la disminución de peso ayuda a mitigar el dolor y permitir al paciente una vida más activa. Por otro lado, el ejercicio aeróbico juega un papel importante en la protección de la articulación al incrementar la fuerza muscular y mejorar el flujo sanguíneo en la articulación, la nutrición del cartílago y el rango de movilidad articular. El calor y el frío aplicados de diferente forma, pueden ser útiles para aliviar el dolor ⁶⁴.

Los tratamientos farmacológicos para la OA pueden ser de diferentes tipos tales como analgésicos simples, antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y el uso de terapias intraarticulares. Este tipo de tratamientos reducen los síntomas de la OA, aunque su eficacia es limitada. El tratamiento de la OA con medicamentos supone el uso de analgésicos como el paracetamol ⁶⁵. En estadios más avanzados, se utilizan otro tipo de antiinflamatorios no esteroideos denominados AINE (en concreto, los inhibidores de la COX-2). Los distintos tipos de AINE reducen el dolor e inflamación articular; sin embargo, el abuso de este tipo de medicamentos podría aumentar el riesgo de problemas cardiovasculares. Las terapias intraarticulares son utilizadas en una minoría de casos. La administración intraarticular de corticosteroides presenta beneficios a corto plazo y una serie de efectos secundarios, así como también, un coste elevado ^{66,67}. Por otro lado, también pueden inyectarse fármacos

denominados condroprotectores como el ácido hialurónico. En cualquier caso, ninguno de estos tratamiento logra frenar el avance de la enfermedad.

Los tratamiento quirúrgicos son considerados cuando el resto de tratamientos ha fallado ⁶⁸. Entre los tratamientos quirúrgicos se incluye: (i) La artroscopia que se usa en pacientes con síntomas mecánicos. No ha sido demostrado que esta operación reduzca significativamente el dolor en la articulación cuando es comparada con otro tipo de tratamientos, (ii) la osteotomía que puede retrasar el reemplazamiento de la articulación dañada por una prótesis entre 5 - 10 años. En esta intervención se lleva a cabo el corte de un hueso para acortarlo, alargarlo o cambiar su alineación ⁶⁵, y (iii) el reemplazamiento de la articulación dañada por una prótesis; este tipo de tratamiento se lleva a cabo en pacientes en los que los síntomas de la enfermedad son muy severos. Además, la enfermedad debe ser limitante para el paciente disminuyendo su calidad de vida e impidiendo que realice determinadas actividades. El objetivo de esta intervención es el reemplazamiento de la articulación total por una prótesis sintética ⁶⁹.

3. COMUNICACIÓN CELULAR

El mantenimiento de la homeostasis de los tejidos se lleva a cabo mediante mecanismos de comunicación extra-, intra- e intercelular ⁷⁰. Una célula en condiciones fisiológicas normales es capaz de captar señales procedentes de moléculas solubles localizadas en el espacio extracelular y provenientes tanto de la matriz como de las células vecinas. Las moléculas de adhesión que median las interacciones entre célula – célula y célula – matriz son multifuncionales, proporcionando tanto soporte estructural como interacciones entre las células y el medio que las rodea. Estas proteínas son capaces de intervenir en la organización del citoesqueleto así como participar y activar diferentes cascadas de señalización ⁷¹.

La alteración de los complejos de adhesión provoca interferencias en el comportamiento normal de las células y por lo tanto en la fisiología de normal funcionamiento de los tejidos, lo que desemboca en diferentes alteraciones que pueden originar la aparición de diferentes enfermedades, incluyendo diferentes tipos de tumores ⁷². Entre las moléculas de adhesión célula – célula y célula – matriz, la comunicación intercelular directa a través de uniones comunicantes (UC) es esencial en el mantenimiento de la función y homeostasis de los tejidos ⁷²⁻⁷⁷. Las conexinas (Cxs) son las proteínas responsables de formar este tipo de canales (UC) que permiten el contacto directo entre dos citoplasmas celulares. Sin embargo hace unos años se han descrito un nuevo tipo de proteínas, que comparten homología estructural con las conexinas, y se denominaron panexinas que también podrían formar este tipo de canales y permitir el intercambio de componentes entre dos células en contacto ^{71,78-83}. Tanto las conexinas como las panexinas son capaces de formar lo que se denomina como hemicanales, que son canales que permiten la comunicación directa e intercambio de moléculas entre la célula y la matriz que la rodea.

3.1. Proteínas implicadas en la comunicación celular

Las conexinas (Cxs), panexinas (PANX) e inexas (Inxs) son las proteínas responsables de la formación de canales que permiten el intercambio de diferentes sustancias y metabolitos entre células adyacentes o entre una célula y el medio extracelular que la rodea ⁸⁴. Las Inxs son características de invertebrados. Se han encontrado 25 genes que codifican para Inxs en *Caenorhabditis elegans* y 8 genes en *Drosophila melanogaster*. La familia de las Cxs es característica de vertebrados; en la especie humana existen 21 genes que codifican para Cxs. En el caso de las Panxs se han descrito 3 miembros de esta familia panexina 1 (PANX1), panexina 2 (PANX2) y panexina 3 (PANX3) ^{84,85}.

Las Cxs y PANX son proteínas transmembrana formadas por un dominio citoplasmático N-terminal (NT), cuatro dominios transmembrana (TM; TM1, TM2, TM3, TM4), dos dominios extracelulares en bucle (EL; EL1, EL2), un dominio citoplasmático en bucle (CL) y un dominio citoplasmático C-terminal (CT) (**Figura 10**). Tanto las Cxs como las PANX presentan funciones estructurales comunes tales como la capacidad de formar uniones comunicantes y hemicanales. A pesar de que esto ha sido descrito, el papel de las Panx como proteínas formadoras de uniones comunicantes funcionales, todavía está en debate ⁸⁶.

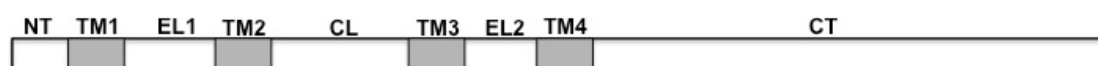


Figura 10. Representación esquemática de la estructura de las conexasinas y panexinas. Se representan los diferentes dominios que forman estas proteínas transmembrana. Dominio N-terminal citoplasmático (NT). Dominios transmembrana (TM; TM1, TM2, TM3, TM4). Dominios extracelulares en bucle (EL; EL1, EL2). Dominio en bucle citoplasmático (CL). Dominio C-terminal citoplasmático (CT). Imagen obtenida y adaptada de: *D'hondt, C. et al. Biol.Cell. 2013*.

3.1.1. Conexasinas

Las Cxs se nombran de acuerdo a dos sistemas diferentes ^{70,87}. El primero se trata de un sistema numérico, en donde el peso molecular de la proteína inferido a partir de la secuencia de ADNc (Ácido Desoxirribonucleico complementario) denota el nombre de la Cx. Por ejemplo Cx26 o Cx43, donde el número se refiere a una Cx cuyo peso molecular es 26 KDa o 43 KDa respectivamente. El segundo se basa en la similitud de longitud de las secuencias del dominio citoplasmático de las diferentes Cxs; de este modo pueden clasificarse en tres subgrupos: α , β y γ . Además, dentro de cada subgrupo cada Cx lleva un número asociado que se corresponde con el orden en el que fueron descubiertas dentro de cada subgrupo. Por ejemplo: GJ α 1 (Cx43).

La mayoría de las Cxs comparten la estructura del gen que está formado por dos exones separados por un intrón. El intrón, que presenta tamaño variable, se sitúa dentro de la región 5'UTR, mientras que el segundo exón contiene la secuencia que codifica para la conexina (Cx) y la región 3'UTR ⁷¹. Además, los genes que codifican para Cxs presentan promotores específicos para cada tejido dando lugar a diferentes sitios de inicio de la transcripción y diferentes regiones 5'UTR ⁸⁸.

Las Cxs, como ya se ha comentado en el apartado anterior (**Figura 10**), están formadas por 9 dominios. El dominio citoplasmático en bucle y el dominio C-terminal varían en longitud y secuencia lo que hace que las funciones de las Cxs sean diferentes, así como también permite la existencia de diferentes tipos de Cxs. El dominio N-terminal, el citoplasmático en bucle y el C-terminal se localizan en el citosol, esto permite la interacción con otras proteínas como por ejemplo con las cateninas. Las interacciones con otras proteínas son esenciales para la modulación de la vida media de las Cxs y sus funciones ⁸⁹.

Las Cxs son traducidas en secuencias polipeptídicas en el retículo endoplasmático (RE), seguido de la liberación de la proteína al lumen del RE hasta que la traducción está completa (**Figura 11**). Esto va seguido del plegamiento de la proteína y posterior paso al aparato de Golgi (AG), donde las Cxs oligomerizan y son transportadas en el interior de vesículas hacia la membrana plasmática a través de los filamentos de actina y microtúbulos del citoesqueleto

90

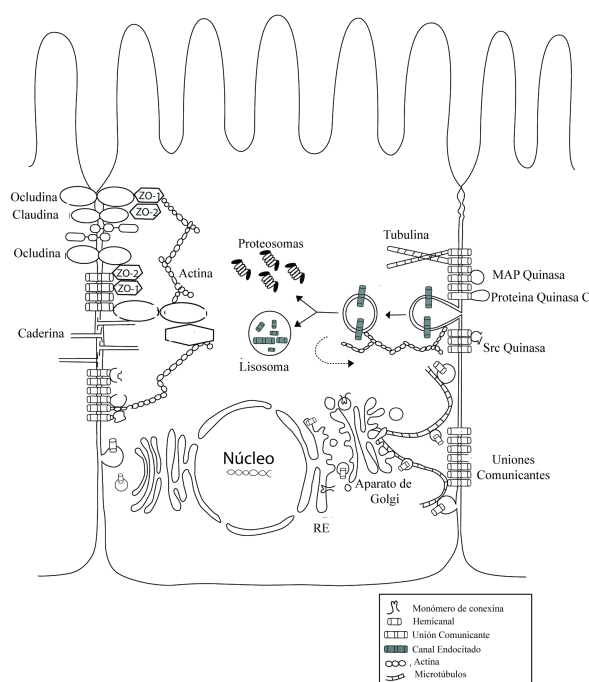


Figura 11. Síntesis de las conexinas y asociación con otras proteínas. La síntesis se produce en el RE, viajan al AG donde se ensamblan en vesículas que viajan a través de los microtúbulos y filamentos de actina a la membrana plasmática donde forman los hemicanales y las UC. Imagen obtenida y adaptada de: *Dbouk, H.A. et al. Cell Commun Signall. 2009.*

Las Cxs tienen una vida media corta, tan sólo unas pocas horas; por este motivo la célula está programada para su continua síntesis y degradación ^{91,92}.

En la membrana plasmática, las Cxs organizadas en grupos de seis forman los denominados hemicanales o conexones. Los hemicanales pueden estar formados por Cxs del mismo tipo (homoméricos) o por Cxs diferentes (heteroméricos). Cuando dos hemicanales de dos células adyacentes se unen forman lo que se conoce como UC, que permite el paso de iones y metabolitos entre células adyacentes. Del mismo modo que para los hemicanales, las UC pueden estar formadas por la unión de dos hemicanales idénticos (homotípicas) o diferentes (heterotípicas) (**Figura 12**). Una misma célula puede expresar diferentes tipos de Cxs, por lo que puede formar hemicanales heteroméricos, aunque no todas las conexinas son capaces de interaccionar entre ellas ^{93,94}. Las UC formadas por hemicanales heteroméricos presentan diferentes propiedades que aquellas formadas por hemicanales homoméricos, lo que amplifica las posibilidades de regulación y funciones de las UC y hemicanales ^{95,96}.

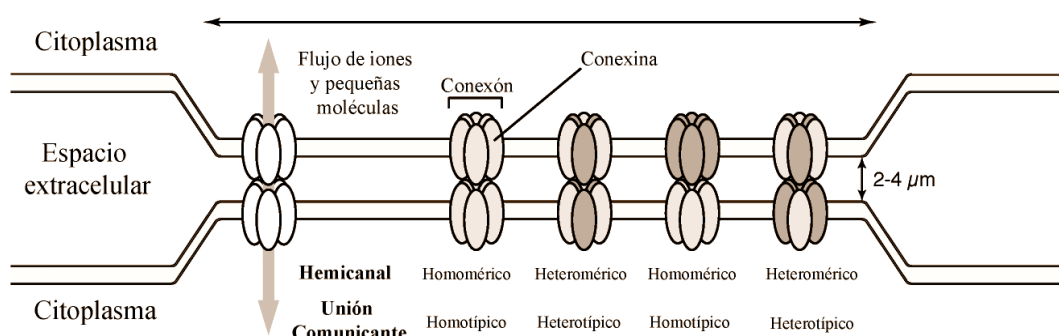


Figura 12. Composición de las uniones comunicantes. Dos hemicanales de dos células adyacentes se unen y forman un canal que permite el paso de iones y pequeñas moléculas. Cada hemicanal está formado por 6 Cxs. En la especie humana existen 21 tipos de Cxs; en la imagen las diferentes Cxs se simbolizan en color distinto (blanco o gris). Se representan también las dos posibilidades para la composición de los hemicanales (homoméricos o heteroméricos) y para las UC (homotípicas o heterotípicas). Imagen obtenida y adaptada de: Shimizu, K. et al. *Current Biology*. 2013.

El flujo de moléculas a través de las UC incluye la difusión pasiva de pequeñas moléculas (< 1.2 kDa) como metabolitos, nutrientes y segundos mensajeros (ATP, glucosa, IP3, AMPc o Ca^{+2}). La comunicación intercelular a través de UC y hemicanales, regula el funcionamiento de varios órganos entre los que se incluyen el sistema nervioso central, corazón, hígado, pulmón, oído y piel, entre otros (**Tabla 2**) ^{97,98}. De hecho, mutaciones en los genes de las conexinas o la pérdida de función de este tipo de comunicación, se han relacionado con el desarrollo de diferentes enfermedades ^{99,100}.

Hasta hace poco tiempo la comunicación celular a través de estos canales se entendía como un mecanismo pasivo para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado la activa implicación de las UC en la comunicación y señalización celular ⁷¹. Las UC habían sido descritas como vías de comunicación que permitían el paso de todo tipo de moléculas e iones cuyo peso no superase 1.2 kDa ⁹⁶. Sin embargo, estudios más recientes demostraron que cada canal que se forma presentan propiedades de apertura y permeabilidad específicas para determinadas moléculas ¹⁰¹. La conductancia eléctrica (voltaje) de cada canal depende del tipo de Cx que lo forme. La apertura/cierre y permeabilidad de los hemicanales y las UC está regulada por diferentes estímulos celulares, entre los que destacan la concentración de Ca^{+2} o el pH ^{93,102}. Existe una serie de moléculas como, por ejemplo, el ácido α -glicirretínico (α GA), heptanol, 1-octanol o ácido araquidónico, que son considerados como inhibidores de la actividad de las UC. Por otro lado, existen los denominados péptidos miméticos de las Cxs, que se trata de secuencias que se corresponden con dominios extracelulares de las Cxs y que se usan como inhibidores de la actividad de estas proteínas ¹⁰³.

	Función	Órgano
Conexinas	<i>Muerte celular</i>	Cerebro. Oído interno. Riñón. Hígado
	<i>Diferenciación</i>	Hueso. Cerebro. Oído interno. Corazón. Ovario. Pulmón. Hígado
	<i>Proliferación / supervivencia</i>	Cerebro. Hueso. Corazón. Lente. Ovario. Testículos. Hígado
Uniones Comunicantes	<i>Conductancia iónica</i>	Cerebro. Oído interno. Corazón. Riñón. Lente. Pulmón
	<i>Acoplamiento metabólico</i>	Cerebro. Lente. Hígado
	<i>Difusión de segundos mensajeros</i>	Oído interno. Ovario. Pulmón. Hígado
Hemicanales	<i>Protección al daño</i>	Corazón
	<i>Precondicionamiento</i>	Cerebro. Corazón
	<i>Señalización extracelular</i>	Hueso. Cerebro. Riñón. Ovario. Pulmón. Hígado
	<i>Respuesta mecánica</i>	Hueso. Ovario

Tabla 2. Funciones de las conexinas y sus canales en los diferentes órganos y tejidos. Las uniones comunicantes y los hemicanales formados en ambos casos por Cxs, intervienen en el funcionamiento de diferentes órganos y tejidos. En la parte superior se muestran las funciones de las Cxs en la regulación de la muerte celular, diferenciación y proliferación. La parte central muestra el papel de las UC en el acoplamiento metabólico y en la difusión de segundos mensajeros entre otros. Por último, en la parte inferior se resume la implicación de los hemicanales en órganos como el corazón, hueso o cerebro. Imagen obtenida y adaptada de: Kar R, Batra N et al. *Biochemistry&Biophysics*. 2012.

La conexina 43 (Cx43) es la conexina más estudiada y se trata de una proteína ampliamente distribuida en los diferentes tejidos de organismos vertebrados. Podemos encontrarla en las células epiteliales, astrocitos, células del miocardio, así como también en las células del músculo liso, condrocitos, sinoviocitos o células del hueso, entre otras ¹⁰⁴. Su expresión es esencial para el mantenimiento del correcto funcionamiento de muchos órganos y tejidos. Niveles elevados de Cx43 se relacionaron con el desarrollo de diferentes patologías entre las que se incluyen procesos inflamatorios y de degeneración tisular ^{105,106}. Alteraciones en la función o expresión de la Cx43 afectan a diferentes rutas de señalización celular, procesos de diferenciación o proliferación celular ^{99,107}. De hecho, la Cx43 es un potente factor supresor de tumores, y esta actividad no siempre se ha correlacionado con la función del canal ¹⁰⁸.

La actividad y estabilidad de la Cx43 dependen en gran medida de las diferentes modificaciones postraduccionales que sufre la proteína. Las modificaciones postraduccionales (MPTs) son cambios covalentes en las proteínas que modifican sus propiedades mediante la adición o pérdida de determinados grupos funcionales. Las MPTs determinan la actividad, localización y la interacción con otras proteínas ¹⁰⁹. Se presenta un breve resumen las principales MPTs que sufren las proteínas y de la función que ejerce cada una de ellas en la **tabla 3** ¹¹⁰.

MPTs	Función
Fosforilación pTyr pSer, pThr	Activación/inactivación de la actividad enzimática, modulación de interacciones moleculares, señalización
Acetilación	Estabilidad de la proteína, protege el dominio N-terminal. Regulación de la interacciones proteína-ADN (histonas)
Metilación	Regulación de la expresión génica
Hidroxilación	Estabilidad de las proteínas, interacciones proteína-ligando
Acilación, modificación con ácidos grasos	Localización celular, median interacciones proteína-proteína
Glicosilación N-glicosilación O-glicosilación	Señalización y reconocimiento célula-célula, funciones de regulación
Ubiquitinización	Señalización para la degradación
Deaminación	Posible regulación de las interacciones proteína-ligando, proteína-proteína

Tabla 3. Principales MPTs que sufren las proteínas. En la tabla se detallan las MPTs más importantes que sufren las proteínas así como también la función que llevan a cabo. Tabla obtenida y adaptada de: Mann, M. et al. *Nature*. 2003.

En el caso de la Cx43, la fosforilación, que consiste en la adición de grupos fosfato a los residuos de serina, treonina o tirosina, ocurre a nivel del dominio C-terminal de la conexina. En este proceso han sido identificados diferentes sitios de fosforilación y diferentes quinasas y fosfatasas que regulan este proceso. Los sitios de fosforilación identificados y quinasas se detallan en la **figura 13** ¹¹¹. A día de hoy, se sabe que la estabilidad y degradación de la Cx43 dependen de la fosforilación de la proteína. Además, condiciones patológicas como la isquemia o la diabetes pueden afectar al estado de fosforilación de la proteína y como consecuencia a la actividad de las UC formadas por Cx43 ^{112,113}.



Figura 13. Sitios de fosforilación del dominio C-terminal de la Cx43. Esta figura representa el dominio C-terminal de la Cx43 (aminoácidos 227 – 382) incluyendo los sitios de fosforilación y las quinasas que fosforilan. La fosforilación en residuos de serina (S) se representa en rojo y la de los residuos de tirosina (Y) en azul. CaMkII (quinasa II dependiente de Ca²⁺/cadmodulina); PKG (proteína quinasa G); PKC (proteína quinasa C); MAPK (proteína quinasa mitogénica activada); CK1 (caseína quinasa 1); PKA (proteína quinasa A). Imagen obtenida y adaptada de: *Axelsen, L.N. et al. Frontiers in Pharmacology. 2013.*

La ubiquitinización consiste en la asociación de las proteínas con moléculas covalentes tales como la ubiquitina y está relacionada con el reciclaje de proteínas de modo que la unidades de ubiquitina se asocian a las proteínas y las marca para su destrucción ¹¹⁴. Por otro lado, las conexinas pueden ser sumoriladas por adición de la partícula SUMO (de sus siglas en inglés *small ubiquitin-like modifier*). Por ejemplo, en células HeLa transfectadas se observó que SUMO aumenta la expresión de la Cx43 y la formación de UC ¹¹⁵.

Otro tipo de MPTs incluyen (i) la acetilación consiste en la transferencia de grupos acetil desde el coenzima A (acetil CoA) a determinados residuos de lisina, provocando cambios en la carga neutra de las proteínas, lo que altera sus propiedades biológicas; las histonas, la tubulina y p53 son potenciales sitios de acetilación. (ii) La metilación que es llevada a cabo por dos grupos de enzimas (metiltransferasas y demetilinas) que regulan el estado de metilación de las proteínas diana; la metilación puede ocurrir en diferentes grados (mono-, di- o trimetilación) dentro del mismo residuo, y consiste en la adición de un grupo metilo ($-\text{CH}_3$) a una molécula ¹¹⁰. Y, finalmente, (iii) la hidroxilación que consiste en la adición de grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) a residuos de prolina. Esta modificación está presente en proteínas secretadas y en los complejos de detección de oxígeno.

3.2. Glicosilación de proteínas

El cartílago articular es un tejido muy especial compuesto principalmente por glicoproteínas. Prácticamente todas las proteínas que forman la MEC están altamente glicosiladas, y esta MPT incluye al colágeno tipo II ^{116,117}. La glicosilación juega un papel fundamental en las interacciones célula - célula y célula – matriz ^{118,119,120}.

En el caso de la glicosilación, las proteínas pueden ser modificadas desde que se sintetizan en el RE hasta el lugar donde ejercen su función final mediante la adición de cadenas de carbohidratos. La adición de carbohidratos de distintos tipos a determinadas proteínas mediante un enlace N-glicosídico a un residuo de asparagina (Asn), o mediante un enlace O-glicosídico a un residuo de serina (Ser) o treonina (Thr), se conoce con el nombre de glicosilación (**Figura 14**). Las enzimas que catalizan este tipo de reacciones son las glicosiltransferasas, cuya función consiste en la unión del carbohidrato a la proteína.

Una de las características más destacadas de la unión de carbohidratos a proteínas es la capacidad que tienen de modificar la función de las proteínas. Los oligosacáridos intervienen en mecanismos de reconocimiento celular para, finalmente, estar implicados en procesos de transducción de la señal ¹²¹. Las funciones que pueden desempeñar las proteínas (glicoproteínas) una vez modificadas comprenden desde funciones relativamente poco importantes hasta aquellas cruciales en el desarrollo, crecimiento y supervivencia de los organismos ¹²².

Las cadenas de carbohidratos que forman parte de las glicoproteínas varían dependiendo del tejido y del tipo celular, y además pueden cambiar durante el desarrollo ¹²³⁻¹²⁸. Algunos de estos complejos incluyen glucosa, galactosa, manosa, fucosa, N-acetil glucosamina, N-acetil galactosamina, N-acetilneuramínico o ácidos siálicos. Diferentes moléculas como las citoquinas o factores de diferenciación pueden regular la glicosilación, así como también la expresión de diferentes glicosiltransferasas. Los ácidos siálicos son azúcares de 9 carbonos cargados negativamente localizados en la posición terminal de los N- u O- oligosacáridos que forman parte de las glicoproteínas. Debido a que no pueden ser reducidos, los ácidos siálicos intervienen en gran cantidad de procesos de reconocimiento celular, así como también en procesos de invasión en células tumorales ¹²⁹⁻¹³².

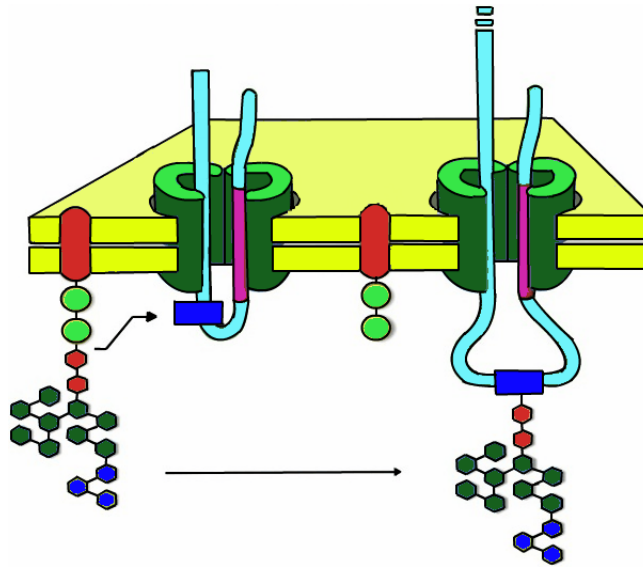


Figura 14. Representación esquemática de la reacción de glicosilación mediada por glicosiltransferasas. A la izquierda se representa una proteína de membrana sin glicosilar, mientras que cuando se une una molécula de carbohidrato (derecha) se obtiene una glicoproteína. Imagen obtenida y adaptada: <http://chemistry.tutorvista.com/biochemistry/glycosylation.html>

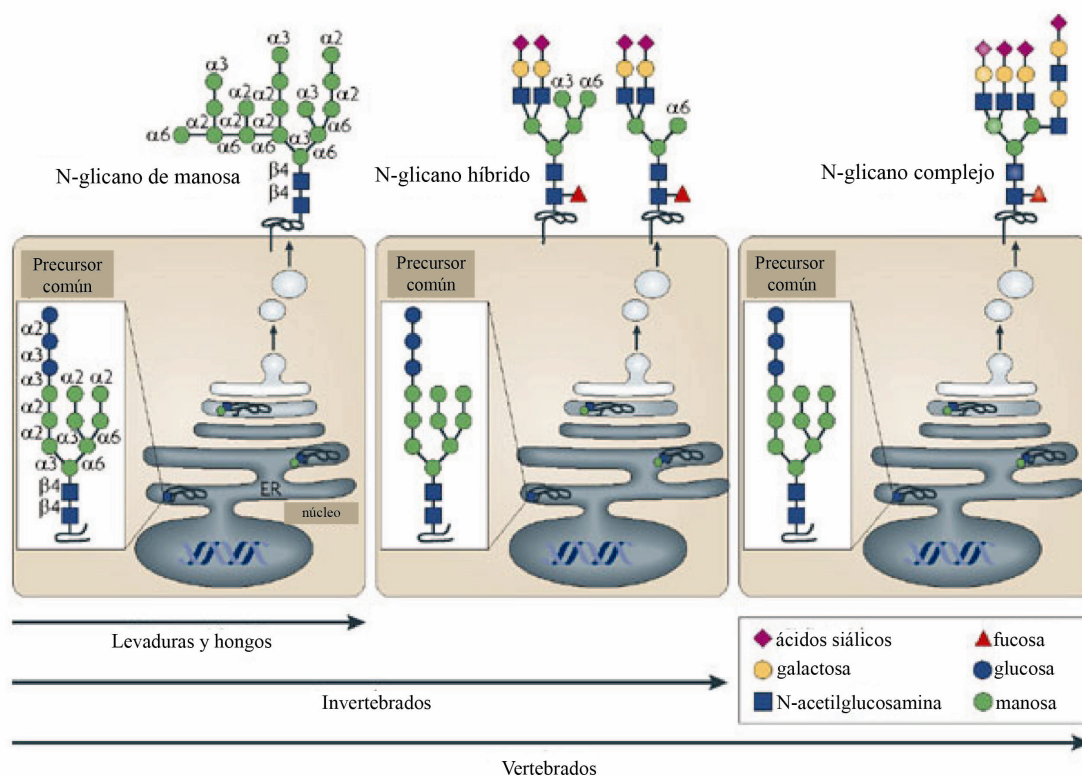


Figura 15. Unión de oligosacáridos a proteínas. En la imagen se ejemplifica la unión de oligosacáridos a proteínas en levaduras y hongos, invertebrados y por último vertebrados. De izquierda a derecha: (i) unión de un oligosacárido de manosa; (ii) un oligosacárido híbrido compuesto por diferentes carbohidratos (manosa, N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico); (iii) unión de un oligosacárido formado por un complejo de carbohidratos. Imagen obtenida y adaptada de: *Opdenakker, G. et al. FASEB J. 1993.*

Los ácidos siálicos son transferidos a las glicoproteínas mediante la acción de la familia de enzimas denominadas sialittransferasas (SiaTs), enzimas con patrones de expresión distintos entre tejidos y que pueden unir ácidos siálicos en posición α -2,3, α -2,6 ó α -2,8 siendo las dos primeras posiciones mutuamente excluyentes¹²⁴. La sialización en α -2,3 es característica de glicoproteínas y glicolípidos. Existen al menos 6 tipos diferentes de SiaTs que son las responsables de su síntesis. El aumento de residuos de ácido siálico en posición α -2,3 se ha asociado con procesos de adhesión en invasión celular en algunos tipos de cáncer como por ejemplo el melanoma¹²¹.

La sialización en α -2,6 podemos encontrarla formando parte de N-glicoproteínas, O-glicoproteínas y glicolípidos. Una familia de 6 SiaTs son las responsables de su síntesis¹²¹. La presencia de ácidos siálicos en posición α -2,6 es mutuamente excluyente con la α -2,3, siendo el cambio de α -2,6 a α -2,3 crucial en el desequilibrio de determinadas funciones celulares como por ejemplo la osteoclastogénesis, la endocitosis de células dendríticas y alteraciones en la adhesión en células cancerígenas de colon¹³³⁻¹³⁵.

Por otra parte, se han encontrado glicoproteínas que presentan sialización en α -2,8 en proteínas del sistema nervioso central de vertebrados. Podemos encontrarla también en proteínas de otros tejidos durante el desarrollo y embriogénesis. Existen al menos 5 SiaTs que median la síntesis y adición de ácido siálico en este tipo de enlace ¹²¹.

Dado que la presencia de ácidos siálicos en posición terminal en las glicoproteínas está relacionada con diferentes funciones celulares, alteraciones en su síntesis, enlace o degradación pueden dar lugar a distintas situaciones patológicas. De hecho, cambios en el nivel de sialización de glicoproteínas se han asociado recientemente con enfermedades como el Alzheimer ¹²⁴. Estudios recientes sugieren que un incremento en las proteínas sializadas en posición α -2,3 en condrocitos en cultivo se podría correlacionar con el cambio de fenotipo celular que experimentan los condrocitos durante el desarrollo de enfermedades reumáticas, incluyendo la OA y AR ^{123,124}. Sin embargo, la función de las glicoproteínas sializadas en cartílago articular no se ha estudiado en detalle.

3.2.1. Lectinas

Las lectinas son proteínas específicas de unión a carbohidratos cuyo origen puede ser animal, sintetizadas a partir de plantas o microorganismos ^{136,137}. Se caracterizan por no causar estimulación antigénica, aunque su capacidad de unión a la molécula diana es similar a la unión antígeno – anticuerpo ¹³⁸. Presentan propiedades de resistencia a elevadas temperaturas (más de 70°C durante 30 min) y resistencia a la digestión enzimática; algunas son altamente resistentes al ácido gástrico y enzimas proteolíticas del estómago ¹³⁹.

La unión de las lectinas a carbohidratos es reversible y no covalente. Todas presentan al menos dos sitios de unión a carbohidratos, una propiedad esencial para la habilidad de aglutinar células o reaccionar con complejos de carbohidratos ¹⁴⁰. Se ha visto que ejercen funciones de reconocimiento de moléculas en las interacciones célula – célula o de la célula con otras moléculas ¹³⁷.

Existen varios tipos de lectinas dependiendo de su especificidad y en función del sustrato que reconocen: lectinas de unión a (i) glucosa / manosa, (ii) galactosa y N-acetilgalactosamina, (iii) L-fucosa y (iv) ácidos siálicos ¹⁴⁰.

La lectina denominada MASL (por su nombre en inglés *Maackia amurensis seed lectin*) se une específicamente a glicoproteínas que contienen ácido siálico en posición terminal α -2,3 ¹⁴¹. MASL se obtiene a partir de las semillas de un árbol chino de la familia de las fabáceas

denominado *Maackia amurensis*. MASL ha sido utilizada en diferentes estudios para bloqueo de receptores de membrana que presentan ácidos siálicos en posición α -2,3. En el caso de células de colon tumorales, demostraron que concentraciones nanomolares de MASL inhiben el crecimiento, migración y capacidad tumorigénica ^{141,142}.

II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Son muchos los procesos y factores descritos como potenciales desencadenantes del desarrollo de la artrosis, sin embargo, todavía no se conocen los mecanismos moleculares responsables del desarrollo de la enfermedad.

En este proyecto de tesis se han planteado los siguientes objetivos:

1. Estudiar mecanismos de comunicación celular en cartílago articular y su posible implicación en el desarrollo de la OA.
2. Estudio de la presencia de receptores de membrana y glicoproteínas que contienen ácido siálico en enlace α -2,3 en cartílago articular de donantes sanos y pacientes con OA. Efecto de la lectina MASL en la estructura y función del cartílago articular *in vitro* y en un modelo de experimentación animal.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVO CELULAR Y DE EXPLANTES DE TEJIDO

1.1. Obtención de muestras de cartílago

El trabajo de tesis se llevó a cabo utilizando cartílago articular de la cabeza del fémur (cadera) o cartílago del cóndilo y platillo en el caso de rodilla, proveniente de donantes sanos y pacientes con OA, pertenecientes al Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC – Xerencia de Xestión Integrada de A Coruña, XXIAC) (CAEIG: 2012/094 - PII3/00591) y pertenecientes a la Colección Privada de Muestras Biológicas Humanas (C.0000424. Registro Nacional de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III) autorizada por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de Galicia. En todos los casos se diferenció si la muestra provenía de cadera (sanos y OA de cadera) o de donantes sanos o pacientes con OA de rodilla. El cartílago de la cabeza femoral fue obtenido tras intervención quirúrgica para reemplazamiento de la pieza dañada por una prótesis (pacientes con OA y fracturas o accidentes en caso de muestras de donantes sanos); mientras que el cartílago de rodilla se obtuvo a partir de autopsia de donantes de órganos del CHUAC. El consentimiento informado del paciente fue obtenido previamente a cualquier intervención. Pacientes y donantes de ambos sexos fueron incluidos en este estudio. Se siguieron las recomendaciones del *American College of Rheumatology* (ACR) para organizar las muestras según el diagnóstico y grado de la enfermedad.

1.2. Procesamiento del cartílago y cultivo de condrocitos

El cartílago se laminó en campanas de cultivo de flujo laminar, se troceó y se digirió con 0,5 mg/mL de tripsina (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos (min) a 37°C en agitación. Pasado este tiempo, se eliminó la tripsina, se añadieron 2 mg/mL de collagenasa tipo IV (Gibco BRL, Invitrogen) preparada en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Invitrogen Life Technologies) suplementado con 5% suero bovino fetal (SBF) (Gibco, Invitrogen) y se dejó actuar durante aproximadamente 16 horas (h) en un agitador orbital a 37°C. El digerido celular obtenido, fue filtrado a través de filtros de 0,22 µm (Millipore) y la suspensión celular resultante fue lavada dos veces con DMEM suplementado con 10% SBF y centrifugada a 1700 rpm durante 10 min. Las células obtenidas se repartieron a razón de millón/mL en frascos de cultivo de 75 y/o 162 cm² en función de los requerimientos del experimento. El cultivo de condrocitos se llevó a cabo durante dos semanas a 37°C y 5% CO₂ en una estufa humificada hasta que los condrocitos alcanzasen una confluencia del 70 – 80%. Una vez alcanzada la confluencia, se subcultivaron en frascos de cultivo de 75 y/o 162 cm² en DMEM

suplementado con 15% suero de embrión bovino (SFT) (Gibco, Invitrogen) y 100 µg/mL de primocín (Invivo Gen Primocin™).

1.3. Obtención de explantes de cartílago

Los explantes de cartílago para cultivo (de tejido) o para realizar tinciones o técnicas de inmunohistoquímica o inmunofluorescencia se obtuvieron únicamente a partir de las muestras de cabeza femoral, al ser estas las muestras que se recogieron inmediatamente tras la intervención quirúrgica (*in situ*). En el caso de congelación, los explantes se laminaron en quirófano y se congelaron utilizando Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound e isopentano en nitrógeno líquido para ser almacenados a -80°C hasta la realización del experimento.

La mayoría del cartílago obtenido y no utilizado para cultivo de tejido o congelación, se utilizó para el aislamiento y cultivo de condrocitos (ver apartado anterior).

1.4. Línea celular T/C-28a2

La línea celular de condrocitos T/C-28a2 fue donada por la Dra. Mary Goldring¹⁴³ por petición de la Dr. María D. Mayán. Esta línea celular mantiene la morfología de los condrocitos en cultivo en monocapa incluso cuando se mantiene durante varios subcultivos¹⁴⁴. El cultivo de esta línea celular se ha llevado a cabo en frascos de cultivo de 75 y/o 162 cm² en función de los requerimientos de cada experimento con medio DMEM suplementado con 15% SFT y 100 µg/mL de primocín.

1.5. A549

Se trata de una línea celular de adenocarcinoma alveolar humano establecida por D.J. Giard en 1972. Se ha utilizado como control negativo en los experimentos de electrofisiología ya que presenta la característica de no formar uniones comunicantes funcionales (<http://www.a549.com>). El cultivo de esta línea celular se ha llevado a cabo en frascos de cultivo de 75 y/o 162 cm² en función de los requerimientos de cada experimento en un medio DMEM suplementado con 15% SFT y 100 µg/mL de primocín. La línea celular fue generosamente donada por el grupo de Oncología del INIBIC.

2. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS Y DE MICROSCOPIA

Para el estudio del cartílago articular, se utilizaron explantes de cartílago que habían sido previamente congelados y almacenados a -80°C . Las células en cultivo, incluido condrocitos primarios, fueron crecidas sobre cámaras de 8 pocillos (Millicell[®] EZ SLIDE, Millipore[™]) y se fijaron con acetona y/o formaldehído al 4% dependiendo de los requerimientos del experimento. Para la fijación con acetona se retiró el medio a cada pocillo de la cámara y se añadieron 200 μL de acetona previamente fría y se dejó actuar durante 10 min a 4°C . Pasados los 10 min se retiró la acetona y cada pocillo se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente las cámaras de 8 pocillos se almacenaron a -20°C hasta a realización de la técnica histológica. La fijación con formaldehído al 4%, se llevó a cabo retirando el medio de cultivo de cada pocillo y añadiendo formaldehído al 4% previamente preparado en tampón fosfato salino (PBS, Dako). Se dejó durante 4 min a temperatura ambiente, se retiró de los pocillos y cada pocillo se lavó con PBS dos veces. Finalmente, se almacenaron a 4°C hasta la realización de la técnica.

En todos los casos, e independientemente de los datos de la historia clínica, se analizaron muestras de tejido para confirmar el grado de la enfermedad utilizando diferentes tinciones histológicas y siguiendo las recomendaciones del método *Mankin score* modificado¹⁴⁵.

2.1. Técnicas histológicas, ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Las técnicas histológicas fueron realizadas por la Plataforma de Histomorfología del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC). Los explantes de cartílago congelado se cortaron en secciones de 4 μm en el criostato (FRIGOGUT 2800). Los cortes resultantes se colocaron sobre un portaobjetos y se deshidrataron con acetona a 4°C durante 10 min, posteriormente se guardaron a -20°C o se utilizaron directamente para las técnicas histológicas e inmunohistoquímicas. Los condrocitos primarios crecidos sobre cámaras de 8 pocillos se mantuvieron en la cámara hasta alcanzar una confluencia del 70 – 80%; posteriormente fueron fijados con formaldehído 4% en PBS (Dako) durante 4 min a temperatura ambiente. Del mismo modo que para los cortes de explantes de cartílago, las cámaras una vez fijadas fueron almacenadas a 4°C o bien fueron utilizadas directamente en las diferentes técnicas.

1.1.1. Técnicas histológicas

Para todas las muestras incluidas en este estudio, se realizaron las siguientes técnicas: hematoxilina-eosina (HE), safranina-O Fast Green (SO Fast Green) y azul de toluidina (AT) que nos permitieron valorar la estructura y composición del tejido. Utilizando estas técnicas se llevó a cabo la clasificación de los diferentes grados de OA utilizando el método *Mankin score* modificado ¹⁴⁵. Las muestras fueron analizadas para detectar anomalías en la celularidad, cantidad de safranina-O (captación de naranja-butano) y fibrilación de la superficie entre otras características, dando una puntuación para cada elemento analizado y donde el total está comprendido entre 1 y 13 para todos los casos. La puntuación obtenida determina el grado de daño; cuanto más alta sea la puntuación obtenida en el *Mankin score*, menor integridad estructural del tejido. Las muestras (pacientes y donantes sanos) fueron divididos en cuatro grupos: i) puntuación de 0 a 1 indica cartílago normal/sano; ii) puntuación de 2 a 3 indica grado I de OA; iii) puntuación de 4 a 5 indica grado II medio de OA y iv) puntuación entre 6 - 13 indica grado IV cuando la puntuación es 6 o 7 y grado V cuando la puntuación está comprendida entre 8 y 13. Todas las muestras fueron analizadas en el microscopio Olympus BX61 utilizando la cámara digital DP71 (Olympus) y los programas DP Controller y DP Manager.

A continuación se resume brevemente el protocolo de cada una de las tinciones utilizadas para el desarrollo de este trabajo de investigación:

I. Hematoxilina – eosina

Los cortes de tejido se tiñeron con hematoxilina de Harris (Merck) durante 5 min, , se pasaron por agua para permitir el viraje y finalmente se tiñeron con eosina (Merck) durante 5 min. Antes del montaje, los cortes fueron deshidratados en una batería de alcoholes (96° dos veces y alcohol de 100°, Panreac Química SAU) y finalmente montados con xileno (Panreac Química SAU) con DePeX (BDH Gun®).

II. Safranina - O Fast Green

La safranina – O Fast Green se realizó para ver el contenido de proteoglicanos de la muestra. Los cortes se tiñeron con una solución que contenía 10 gr de safranina – O, 145 mL agua destilada, 155 mL alcohol 96° durante 30 min. A continuación se lavaron con agua destilada y se tiñeron con 3 pases de una solución que contiene 1gr de verde luz, 100 mL de agua

destilada, 0,5 mL ácido acético glacial y 0,5% agua acética. Posteriormente fueron deshidratados en alcohol de 100° y se montaron en xileno (Panreac Química SAU) con DePeX (BDH Gun[®]).

III. Azul de toluidina

Las muestras se tiñeron durante 5 min con azul de toluidina (Merck). A continuación se lavaron con tampón acetato acético pH 4,2 y se aclararon con agua destilada y finalmente se pasaron por una batería de alcoholes para su deshidratación (96°-100°). Finalmente se montaron con DePeX (BDH Gun[®]) en xileno (Panreac Química SAU).

2.1.2. Ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Para la inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, los cortes histológicos se colocaron sobre un portaobjetos, se rodearon con un lápiz de aceite y se lavaron durante 10 min con PBS. El bloqueo de la peroxidasa endógena (IPE Dako Real[®]) y metanol durante 10 min con un posterior lavado de PBS. A continuación, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario durante una hora; la dilución del anticuerpo primario estaba preparada en un tampón que contenía 0,05 mol/L Tris-HCl pH 7,6 y 1% de suero bovino de albúmina (BSA). Tras tres lavados con PBS, las secciones de cartílago se incubaron con 100 µL de anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (Dako) durante 1 hora. Se realizaron tres lavados con PBS y la actividad peroxidasa fue revelada con una solución tampón que contenía peróxido de hidrógeno pH 7,5 y con diaminobenzidina (DAB, Dako) en una proporción 1:50. Después de un lavado con agua destilada, las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina de Gill III (Merck), deshidratadas en una batería de alcoholes (96°-100°) y se montaron en xileno (Panreac Química SAU) con DePeX (BDH Gun[®]). Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se resumen en la **tabla 4**.

Para las células crecidas en cámara, una vez fijadas y lavadas con PBS, la técnica de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia se llevó a cabo de la misma manera que para los explantes de cartílago congelado. Todas las muestras fueron analizadas en el microscopio Olympus BX61 utilizando la cámara digital DP71 (Olympus) y los programas DP Controller y DP Manager. La calibración y cuantificación de las imágenes se llevó a cabo utilizando el programa AnalySIS^D 5.0 (Olympus Biosystems Hamburg, Germany).

Anticuerpo	Referencia	Técnica
<i>Mouse anti-SOX9</i>	Abcam (ab76997)	Inmunohistoquímica
<i>Mouse anti-Collagen II</i>	Abcam (ab3092)	Inmunohistoquímica
<i>Mouse anti-Connexin-43</i>	BD Transduction Laboratories™	Inmunohistoquímica
<i>Mouse anti-Connexin-45</i>	Millipore, MAB 3101	Inmunohistoquímica
<i>Mouse anti-Connexin 32</i>	Abcam (ab66020)	Inmunohistoquímica
<i>Mouse anti-Connexin 46 (C-3):sc-365394</i>	Santa Cruz Biotechnology, INC	Inmunohistoquímica
<i>Mouse anti-PCNA (Ab-1)</i>	Calbiochem® (NA03)	Inmunohistoquímica
<i>Rat anti-Podoplanin</i>	Sigma - Aldrich® (P0085)	Inmunohistoquímica*
<i>Mouse MMP-13 (Collagenase-3) Ab-1</i>	Thermo Scientific	Inmunohistoquímica*
<i>Mouse anti-MMP3 (Stromelysin-1)</i>	Millipore, MAB 3369	Inmunohistoquímica*
<i>Connexin 43 (C-20):sc-6560</i>	Santa Cruz Biotechnology, INC	Western – blot
<i>Anti-Goat Immunoglobulins/HRP</i>	DakoCytomation, P 0449	Western–blot, secundario
<i>FITC</i>	Abcam	Inmunofluorescencia
<i>DAPI</i>	Sigma - Aldrich®	Inmunofluorescencia

Tabla 4. Anticuerpos utilizados. Se indica el nombre del anticuerpo y especie de origen (primera columna), casa comercial (columna central) y la técnica en la que se han utilizado (columna final). El * marca aquellos anticuerpo que se han utilizado en más de una técnica (inmunohistoquímica e inmunofluorescencia). FITC se utilizó para detectar la podoplanina en inmunofluorescencia y DAPI para tinción de los núcleos.

2.2. Microscopía electrónica de barrido

Los explantes de cartílago congelado en medio Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound que habían sido almacenados a -80°C se cortaron en secciones de aproximadamente 0,1 – 0,3 mm con ayuda de un bisturí, se descongelaron a temperatura ambiente sumergiéndolos en tampón cacodilato 0.2 M pH 7.4; a continuación fueron deshidratados en una batería de etanol a diferentes concentraciones, secados y recubiertos con oro. Las imágenes se obtuvieron a temperatura ambiente utilizando el microscopio electrónico de barrido *Jeol JEM 6400* a 20 kV y el programa de análisis *Inca Energy V.200*. El análisis se realizó utilizando las

instalaciones e infraestructura del SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación, Universidade de A Coruña).

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

El análisis de la expresión de ARNm se compone de diferentes pasos: (1) extracción y cuantificación del ARNm^{146 146} reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa (RT-PCR); (3) reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qPCR).

La extracción de ARNm de células en cultivo se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el manual de instrucciones de *Tryzol® Reagent* (Invitrogen). Las muestras se trataron con etanol frío al 70% para mejorar la precipitación del ARNm. La extracción de ARNm en explantes de cartílago congelado se llevó a cabo en dos pasos: digestión enzimática previa y posterior tratamiento con *Tryzol® Reagent*. Para la digestión enzimática el cartílago congelado fue troceado con ayuda de bisturí y resuspendido en un tampón de digestión que contenía 200 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5% SDS, 100 mM citrato sódico y proteinasa K (Quiagen® Proteinase K). Las muestras fueron incubadas durante toda la noche a 37°C en un agitador. Transcurrido este tiempo, se llevó a cabo la extracción de ARNm siguiendo el protocolo descrito anteriormente (*Tryzol® Reagent*, Invitrogen).

En alguno de los experimentos realizados se utilizó un segundo método para la extracción de ARN de explantes de cartílago congelado: los explantes de cartílago que habían sido congelados a -80°C se pulverizaron en un mortero previamente enfriado en nitrógeno líquido. A continuación, se añadió 1 mL de QIAzol (74804, Qiagen) a cada tubo y se incubó durante 5 min en hielo. 200 µL de cloroformo se añadieron a cada una de las muestras, se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar durante 3 min a temperatura ambiente. El ARNm se aisló utilizando el aparato QIAcube (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para eliminar los posibles restos de ADN, tanto las muestras provenientes de células como explantes de tejido, fueron sometidos a un tratamiento con *RNAase Free-DNAase* (Invitrogen); a cada muestra se le añadió 1 µL de desoxirribosil nucleasa I, 2 µL de tampón de reacción 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl) completando con agua hasta un volumen final de 20 µL. La reacción se incubó durante 15 min a 37°C y se paró con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 25 mM pH 8 durante 15 min a 65°C. La cuantificación de la concentración de ARNm obtenida tras la extracción fue evaluada utilizando técnicas espectrofotométricas (*Nanodrop ND-1000*) a 260 nm y se evaluó la pureza de la extracción hallando el ratio entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm.

La amplificación de ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo utilizando *Superscript® VILO™ cDNA Synthesis Kit* (Invitrogen), donde se realizó la retrotranscripción de 1,5 µg de ARNm. La amplificación consta de los siguientes pasos 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C y finalmente la reacción se mantiene a 4°C.

Finalmente, el estudio de la expresión génica se llevó a cabo utilizando qPCR; las secuencias de los cebadores utilizadas se detallan en la **tabla 5**. Como gen de referencia se utilizó en todos los casos la hipoxantina fosforibosiltransferasa 1 (HPRT1). El diseño de cebadores se llevó a cabo utilizando el programa *Primer3: WWW primer tool* (<http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3>).

El ensayo de amplificación se llevó a cabo en el equipo *LightCycler 480 Instrument Roche Applied Science* utilizando el *Light Cycler 4800 SYBR Green I Master kit*. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en placas ópticas de 96 pocillos utilizando 5 µL de ADNc obtenido tras la RT-PCR, 5 µL de cebador 100 µM (sentido y antisentido) y 10 µL de *SYBR Green* completando un volumen final de reacción de 20 µL. Las condiciones empleadas para la reacción fueron: una incubación de 10 min a 95°C; amplificación de 45 ciclos de: 10 segundos (s) a 95°C y 1 min a 65°C; y finalmente un enfriamiento durante 20 s hasta 4°C. La intensidad de la señal de fluorescencia emitida aumenta proporcionalmente a la cantidad de producto amplificado y, por lo tanto, proporcionalmente a los niveles de ARNm. El análisis se hizo normalizando los datos frente al gen de referencia HPRT1.

		Sentido	Antisentido
GJA1	Cx43m	CAATCACTTGGCGTGA CTTC	AACGAAAGGCAGACTGCTCA
	Cx43p	TTGCAATCTGTGATCCTTGAA	AACGAAAGGCAGACTGCTCA
GJC1	Cx45m	TGGGTAACCGAAGTTCTGGA	CAAATTTGCTTTGCTCATCG
	Cx45p	TGGGTAACCGAAGTTCTGGA	TCCAGGATCCAGGTAAAAACC
GJB1	Cx32m	TGAGACCATAGGGGACCTGT	TCATCACCCACACACTCTC
GJB2	Cx26m	CTTCCTCCCGACGCAGAG	GCTCATCTCCCCACACCTC
GJC1	Cx26p	AAGTCCAGGGAGGAGGAAAA	TCGTATCACACCGGAAATCA
GJA5	Cx40	AAGTCCAGGGAGGAGGAAAA	TCGTATCACACCGGAAATCA
GJA3	Cx46m	ACCGCACGTGTGAAAGGAAT	GAAGATGAACAGCACGGTCA
	Cx46p	ATGCCTGTCCTGTGGAGAAG	GAAGATGAACAGCACGGTCA
PANX1		CAGAGCGAGTCTGGAAACCT	GCAGGCTCCATCTCTCATGT
PANX2		TGCTGGTCACCCTGGTCT	GCGTAGGGCAGGAACTTGT
PANX3		GGGACTCACTGCTTCACCAT	TTTGTCCAGTTCGCTGATGA
CCND1		GGCATCAAAGAGGCAGTAGC	ATCCAGACTGGTCGACATCC
p21		GACTCTCAGGGTCGAAAACG	GCCAGGGTATGTACATGAGCA
MMP3m		CCCTGGGTCTCTTTCACTCA	GCTGACAGCATCAAAGGACA
Col2A1IB		AGGATGTCCGGCAACCAG	CAGGGGTCCCAGGTTCTC
Col2A1IA		GGCCAGGATGTCCAGGAG	CAGATGGGGCAGCACTCTC
IL6		GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA	CTGCAGCCACTGGTTCTGT
COX-2		CTTCACGCATCAGTTTTTCAAG	TCACCGTAAATATGATTTAAGTCCAC
MMP3		CCCTGGGTCTCTTTCACTCA	GCTGACAGCATCAAAGGACA
HPRT1		TTGAGTTTGAAACATCTGGAG	GCCCAAAGGGAAGTATAGTC

Tabla 5. Secuencia de cebadores utilizados en los experimentos de expresión génica. PANX1, PANX2 (panexina 1 y 2); CCND1 (ciclina D1); p21 (inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina); MMP3m (metaloproteasa-3); Col2A1IB (colágeno tipo dos); Col2A1IA (colágeno tipo II); IL6 (interleuquina-6); COX-2 (ciclooxigenasa-2); HPRT1 (hipoxantina fosforibosiltransferasa 1).

4. WESTERN-BLOT

Las mismas cantidades de proteína total se cargaron en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) donde se llevó a cabo la identificación de las proteínas separadas.

4.1. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación de proteínas de acuerdo a su peso molecular se llevó a cabo mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 1.0 mm de grosor. Se utilizaron geles de 10% de acrilamida/bisacrilamida 30% (Sigma-Aldrich) (**tabla 6**). 5 μ L de la muestra fueron tratados con tampón de carga 1X (**tabla 6**), hervidos durante 10 min a 100°C y se cargaron en el gel. La electroforesis se llevó a cabo a 80 V durante 1h y 30 min en una cubeta de electroforesis (Bio-Rad) con tampón de electroforesis 1X (TEF) (**tabla 6**).

4.2. Transferencia a membrana e inmunodetección

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 7x8 cm² (Bio-Rad) previamente activadas durante 5 min en metanol, 5 min en agua, 5 min metanol y finalmente 5 min agua. A continuación se llevó a cabo el equilibrado. Para el equilibrado, la membrana, el gel y las esponjas se pusieron en una cubeta que contenía tampón de equilibrado (**tabla 6**) durante 15 min a 4°C. Una vez equilibrados, se llevó a cabo la transferencia de las proteínas separadas desde el gel a la membrana. Dicha transferencia se realizó a 20 V durante 1 h utilizando el aparato *Trans-Blot semi-dry Transfer Cell* (Bio-Rad). Una vez finalizada la transferencia, las membranas se incubaron con una solución de bloqueo (**tabla 6**) para evitar las uniones inespecíficas durante 1 h, en agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente, se dejaron durante toda la noche incubando en presencia del anticuerpo anti-Cx43 (ver **tabla 4** anticuerpos) preparado en una solución que contenía solución de bloqueo y tampón de lavado 1X. Transcurridas las 18 h, cada membrana se lavó 4 veces durante 15 min con un tampón de lavado 1X (**tabla 6**) para eliminar los posibles restos de anticuerpo primario. A continuación, se incubó la membrana con una solución (solución de bloqueo y tampón de lavado 1X) que contenía el anticuerpo secundario (cabra anti-Cx43, ver **tabla 4** anticuerpos) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se llevó a cabo el lavado de la membrana utilizando tampón de lavado 1X. Finalmente, las proteínas se visualizaron empleando un *kit* de quimioluminiscencia (GeHealthcare) que permite la detección de antígenos usando anticuerpos conjugados con peroxidasa al añadir luminol como

sustrato. El luminol se transforma en 3-aminofalato emitiendo luz a 428 nm. Las imágenes se visualizaron usando una cámara LAS3000 (Fujifilm).

Componente	Gel Separador al 10%	Gel Concentrador
Acrilamida / Bisacrilamida 30%	3,33 mL	400 µL
Agua	4,68 mL	2,2 mL
Tris 2M pH 8.8	1,88 mL	375 µL
SDS 10%	100 µL	30 µL
PSA 20%	25 µL	12 µL
TEMED	12 µL	3 µL

Composición	
Tampón de Carga 1X	10% SDS; 200 mM Tris-HCl pH 6,8; 50% Glicerol; 0,1% Azul de bromofenol; 10% β-mercaptoetanol
Tampón de Electroforesis (TEF)	30,3 g Tris-Base; 144 g Glicina; 10 g SDS
Tampón de Equilibrado	20% metanol; TEF 10X, agua destilada
Tampón de Lavado 10X	2 mM Tris-Base; 150 mM NaCl
Tampón de Lavado 1X	Tampón de Lavado 10X; 0,05% Tween® 20
Solución de Bloqueo	5% leche en tampón de lavado 1X

Tabla 6. Composición de los geles de poliacrilamida y composición de los tampones utilizados para la detección de proteínas en membranas de nitrocelulosa. SDS (dodecilsulfato sódico), PSA (persulfato amónico).

5. ESTUDIOS DE ELECTROFISIOLOGÍA

5.1. *Dual voltage-clamp*

Esta técnica fue realizada en colaboración con el laboratorio de los doctores Peter Brink y Virgin Valiunas de la *Stony Brook University* de Nueva York¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando condrocitos primarios crecidos durante 2 – 5 semanas en DMEM suplementado con 15% SFT y 100 µg/mL de primocín que fueron enviados desde el INIBIC. Los experimentos se realizaron con pares de células. Las células se colocaron sobre un portaobjetos experimental y se llevaron a un microscopio invertido (Olympus IX71) acoplado a un sistema de fluorescencia. El portaobjetos fue tratado a temperatura ambiente (22°C) con una solución que contenía 150 mM NaCl, 150 mM KCl, 150 mM CaCl₂, HEPES pH 7,4 y glucosa 5 mM. Además, esta solución se suplementó con 2mM CsCl y 2 mM BaCl₂. Para comprobar que las células formaban canales voltaje - dependientes se utilizaron pipetas especiales cargadas con una solución específica que contenían 120 mM K⁺ aspartato, 10 mM

NaCl, 3mM MgATP, HEPES pH 7,2, EGTA (pCa 8); previamente a cargar la pipeta la solución fue filtrada utilizando un filtro de 0,22 μ m de poro. Las pipetas una vez cargadas presentaban una resistencia de 1- 4 M Ω .

El protocolo para generar y/o detectar la presencia de canales voltaje – dependientes en condrocitos articulares humanos, se llevó a cabo del siguiente modo: se aplicó un voltaje positivo y negativo de 2 segundos de duración seguido de otro de amplitud similar pero de diferente polaridad e igual duración. Los diferentes pasos se aplicaron desde 10 mV en incrementos de 20 mV hasta alcanzar los 110 mV. Las señales de voltaje emitidas fueron recogidas mediante amplificadores (Axopatch 200B). Además, las señales fueron digitalizadas utilizando un convertidor (Digidata 1322A, Molecular Devices) y guardados en un ordenador. Los datos y el análisis de los mismos fue realizado con el programa *pClamp9* (Molecular Devices). El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa *SigmaPlot* y *SigmaStat* (Jandel Scientific).

5.2. Inyección del fluoróforo

Esta técnica fue realizada en colaboración con el laboratorio de los doctores Peter Brink y Virgin Valiunas de la *Stony Brook University* de Nueva York ¹⁵¹. El *Lucifer Yellow CH*, *Lithium Salt* (LY, Molecular Probes®) se cargó en las pipetas disuelto hasta una concentración final de 2 mM. El LY es un compuesto fluorescente que es inyectado en el interior de las células y se puede usar tanto en células vivas como en células fijadas para ser observadas bajo un microscopio de fluorescencia. No es permeable por lo que no sale de la célula y se intercambia a través de las uniones comunicantes ^{101,152}. Las células analizadas estaban eléctricamente acopladas; el LY fue inyectado mediante la técnica de *dual voltaje – clamp* en una de las células con el objetivo de ver si existía transferencia directa entre células en contacto. La fluorescencia se midió utilizando una cámara digital (CCD-camera, HRm Axiocam, 14-bit, Carl Zeiss) y un programa informático *Axion Vision* (Carl Zeiss). La emisión de fluorescencia de las células inyectadas y las receptoras se midió a lo largo del tiempo.

5.3. Ensayo de electroporación

El ensayo de electroporación utilizando *InSitu Porator* (Cell projects) se llevó a cabo con el objetivo de estudiar la transferencia de nutrientes como la glucosa y otras moléculas como LY entre células en contacto. Para este ensayo, se utilizaron células crecidas en una cámara (Cell projects) que contiene un electrodo transparente que cubre la mitad de la superficie y no

afecta al crecimiento celular. Las células fueron crecidas en condiciones normales como se indica a continuación. El péptido mimético GAP27 (Sigma-Aldrich) se utilizó para inhibir los canales funcionales formados por Cx43. GAP27 fue preparado a una concentración final de 250 μ M en DMSO. Las células fueron incubadas con esta solución durante 1 h antes de realizar el experimento. GAP27 bloquea parcialmente los canales formados por Cx43 por lo que como segundo control del experimento se utilizó la línea celular A549 al no presentar UC funcionales.

La capacidad de los condrocitos para intercambiar glucosa fue analizada utilizando una molécula de glucosa fluorescente denominada 2-(N-(7-Nitobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxiglucosa (2-NBDG) preparada a una concentración final de 1 mg/mL en *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS, Gibco-Invitrogen). El ensayo se llevó a cabo en cámaras de 8 pocillos especiales para la electroporación (Cell projects). Cada cámara consta de dos regiones que a su vez se dividen en dos zonas separadas por un electrodo transparente (**Figura 16, electrodo en negro**). El electrodo determina el eje de electroporación. En cada pocillo: la zona comprendida entre los dos electrodos (**figura 16**), se corresponde con la zona electroporada; mientras que la zona de los extremos de la cámara (**figura 16**) se corresponden con la zona no electroporada. Las células localizadas en la zona electroporada captan la 2-NBDG una vez se electroporan en presencia de la solución de incubación que contiene 2-NBDG, mientras que las células localizadas en la zona no electroporada no captan la molécula al no sufrir el proceso de electroporación.

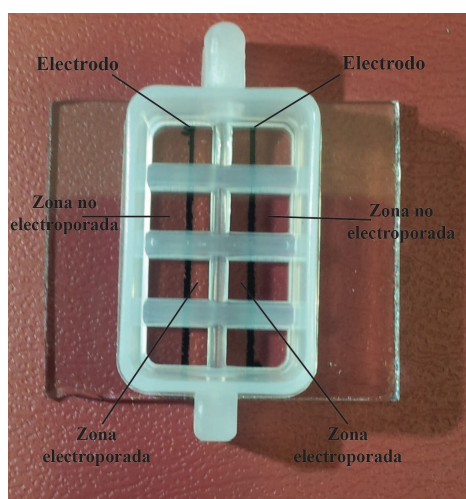


Figura 16. Esquema de la cámara de 8 pocillos utilizada para la electroporación. En la imagen los electrodos se representan de color negro. La región de la cámara comprendida entre los dos electrodos es la que sufre electroporación, mientras que los extremos de la cámara se corresponden con la zona no electroporada.

Este ensayo consiste en una serie de pasos que se resumen a continuación. Una vez las células fueron adheridas a la superficie de la cámara, se retiró el medio y las células se lavaron dos veces con un medio HBSS sin Ca^{+2} ; necesario evitar la presencia de Ca^{+2} en el medio ya que el Ca^{+2} afecta a la apertura/cierre de las UC. Una vez lavadas, se añadió la solución que contenía 2-NBDG y se llevó a cabo la electroporación (45 V) en *InSitu Porator*. A continuación se eliminó el medio con 2-NBDG y las células se lavaron con HBSS sin Ca^{+2} suplementado con 10% SBF dializado (SILANTES GmbH) y se incubaron a 37°C en estufa durante 4 min. Pasado este tiempo se retiró el medio y las células se fijaron con formaldehído al 4% en PBS durante 4 min y temperatura ambiente. Finalmente, se hicieron 5 lavados con PBS y las células se observaron en un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse Ti utilizando el programa NiS Elements.

La cuantificación del número de células positivas para la transferencia de glucosa se llevó a cabo por recuento de las células fluorescentes a partir del borde de electroporación. Este valor se normalizó según el número de células localizadas en el margen del electrodo (última fila de células electroporadas en contacto directo con las células que no sufrieron electroporación).

5.4. Ensayo de hemicanales

El ensayo de hemicanales se llevó a cabo con el objetivo de estudiar la presencia de hemicanales funcionales en condrocitos primarios. Para ello, los condrocitos se crecieron en frascos de cultivo hasta alcanzar una confluencia del 70 – 80%. Una vez alcanzada la confluencia, se pasaron a placas de 12 pocillos donde se llevó a cabo el ensayo; las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron durante 30 min a 37°C con una solución que contenía 0,4% de LY en PBS. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio y las células se lavaron dos veces con una solución que contenía 10% SBF y CaCl_2 3,2 mM en PBS. La presencia de hemicanales funcionales fue analizada en el microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse Ti utilizando el programa NiS Elements.

6. SISTEMA DE CO-CULTIVO EN MEMBRANA POROSA

Para llevar a cabo este protocolo, dos poblaciones de condrocitos primarios procedentes del mismo donante (donante sano y/o paciente con OA) se crecieron bajo dos condiciones diferentes (medio marcado con isótopos y medio sin marcar). Se utilizaron frascos de cultivo de 25 cm² con 25.000 células que fueron mantenidos en cultivo hasta alcanzar una confluencia del 80% a 37°C y 5% CO₂. En una de las condiciones (células donantes), los

condrocitos primarios (frascos de cultivo de 25 cm² con 25.000 células) fueron crecidos en medio SILAC (*SILAC® Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, SILANTES GmbH) marcado con 73 mg/mL de L-lisina [¹³C₆] (SILANTES GmbH) y 28 mg/mL de L-arginina [¹³C₆, ¹⁵N₆] (SILANTES) suplementado con 10% SBF dializado (SILANTES GmbH), 100X de glutamina (SILANTES), 5 µg/mL de penicilina (Gibco, Invitrogen) y 5 unidades/mL de estreptomicina (Gibco, Invitrogen). En la otra condición (células receptoras), los condrocitos crecieron en un medio sin marcar (*SILAC® Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, SILANTES GmbH) que contenía 73 mg/mL de L-lisina (SILANTES) y 28 mg/mL de L-arginina (SILANTES GmbH) suplementado con 10% SBF dializado (SILANTES), 100X de glutamina (SILANTES GmbH), 5 µg/mL de penicilina (Gibco, Invitrogen) y 5 unidades/mL de estreptomicina (Gibco, Invitrogen).

Para estudiar la transferencia de aminoácidos, péptidos y proteínas, se llevó a cabo el denominado co-cultivo en membrana porosa (*transwell*) utilizando membranas de poliéster de 3 µm de poro (Transwell® Permeable Support, Corning) adaptables a placas de 6 pocillos. Este protocolo se divide en 4 etapas (**Figura 17**): (i) Adherencia de las células no marcadas a la parte inferior de la membrana; (ii) adherencia de las células marcadas a la parte superior de la membrana; (iii) 4 horas de cultivo celular en condiciones normales (37°C en estufa y 5% CO₂); (iv) recogida de células, lisado y filtrado; (v) análisis e identificación de aminoácidos, péptidos y proteínas mediante técnicas de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

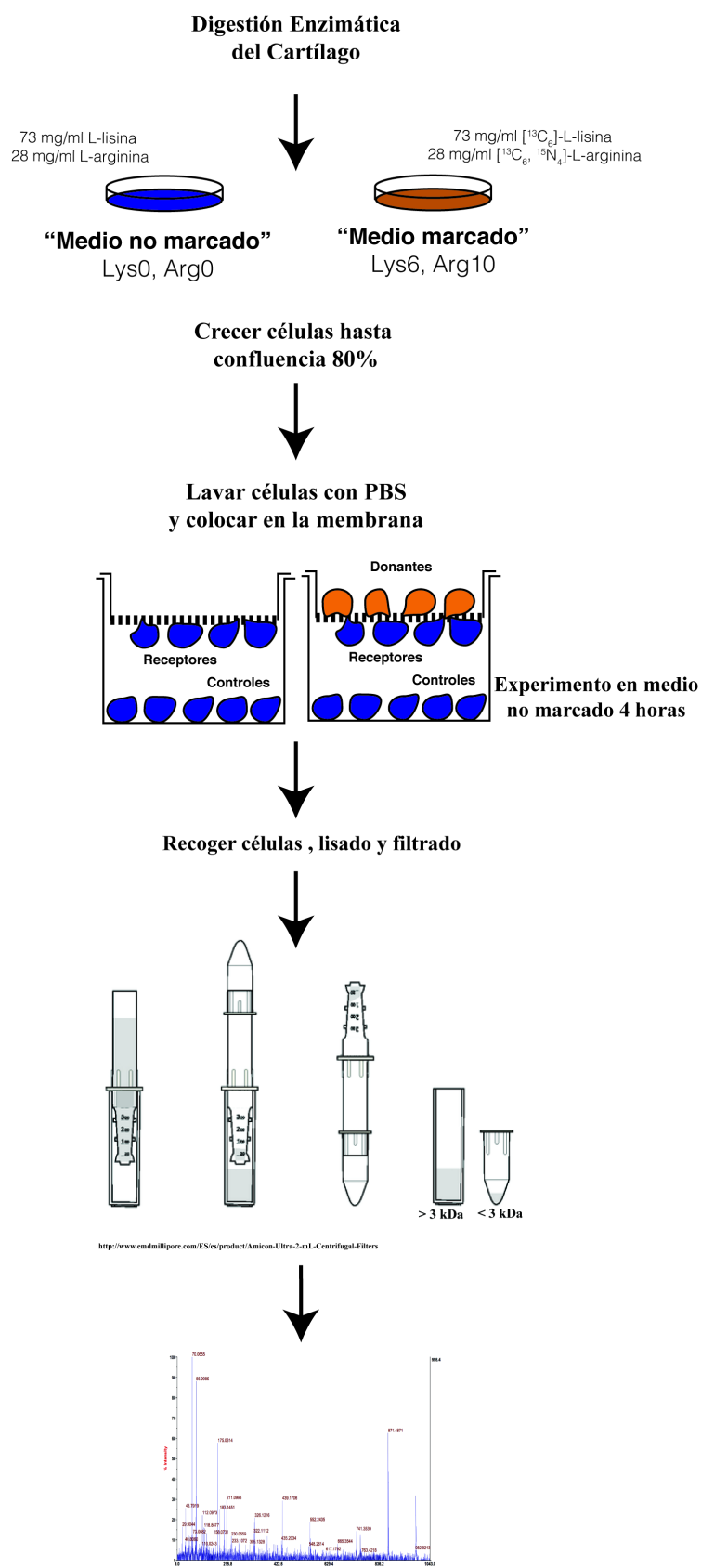


Figura 17. Esquema representativo del proceso de co-cultivo en membrana porosa. En el esquema se representa que las células fueron crecidas en dos medios diferentes (marcado / no marcado), colocadas sobre membrana porosa, separadas en columnas de 3 kDa. Finalmente el lisado obtenido fue analizado mediante espectrometría de masas.

6.1. Adherencia de las células receptoras no marcadas a la membrana

Células creciendo en un frasco de cultivo de 25 cm² se lavaron dos veces con HBSS suplementado con 100 µg/mL de primocín; se trataron con tripsina y centrifugaron durante 5 min a 1800 rpm. 1 mL de células resuspendidas en medio no marcado se añadieron a la parte inferior de la membrana y se dejaron en esa posición en un incubador a 37°C y 5% CO₂ durante 4 horas. Como grupo control 1 mL de células se añadieron en una placa de 6 pocillos y se dejaron 4 horas en un incubador a 37°C y 5% CO₂. El grupo control se utilizó para determinar que la adherencia de las células a la membrana había sido satisfactoria. Además se realizaron técnicas de inmunohistoquímica para comprobar la adherencia de las células a la membrana después de las 4 horas de incubación.

6.2. Adherencia de las células donantes marcadas a la membrana

Células creciendo en un frasco de cultivo de 25 cm² fueron lavadas con HBSS y recogidas utilizando tripsina como en el caso anterior. Tras la centrifugación, se lavaron dos veces con medio fresco no marcado y se resuspendieron en medio no marcado (para evitar falsos positivos). 1 mL de células se añadió a la parte superior de la membrana y se dejaron 4 horas en un incubador a 37°C y 5% CO₂. Como grupo control se utilizó 1 mL de células que fueron añadidas a una placa de 6 pocillos y se dejaron 4 horas en un incubador a 37°C y 5% de CO₂. Como en el caso anterior, el grupo control se utilizó para comprobar que la adherencia había sido satisfactoria.

6.3. Lisado y filtrado

Las células donantes y receptores pegadas en la parte superior e inferior respectivamente fueron incubadas durante 4 horas para permitir la formación de proyecciones celulares y la comunicación celular entre donantes y receptores. Al cabo de este periodo, donantes y receptores se recogieron por separado para proceder con la lisis celular como se explica a continuación: las membranas se lavaron dos veces con PBS. Primero se rasparon con gomas estériles (Sigma-Aldrich) las células localizadas en la parte inferior de la membrana (receptores). Estas células se recogieron en tubos de 1,5 mL (Protein LoBind Tube 1,5 mL, Eppendorf), se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se guardaron a -80°C. Se realizó el mismo procedimiento con las células localizadas en la parte superior de la membrana (donantes) y en la base del pocillo (controles receptores; células que no establecieron contacto directo con las células denominadas donantes).

Para obtener el lisado celular, las células se resuspendieron en 112,5 μ L de la solución de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 1% NP40, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonil (PSMF)) y se dejaron durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se añadió a cada tubo 634,5 μ L de la solución de dilución (10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) y se pasó el contenido de cada tubo por filtros de 3 kiloDaltons (kDa) (Amicon® Ultra-3K, Millipore) con el objetivo de separar los componentes proteicos, por tamaño, de las sales y contaminantes. Las muestras se centrifugaron durante 40 minutos a 4000 g. Tras la centrifugación se obtienen dos fracciones: mayor de 3 kDa (parte superior del filtro) y menor de 3 kDa (parte inferior del filtro) que se guardaron a -80°C para su análisis por técnicas proteómicas utilizando LC-MS/MS.

6.4. Transferencia e identificación de aminoácidos

El estudio de la transferencia de aminoácidos libres (L-lisina y L-arginina) se llevó a cabo utilizando la fracción menor de 3 kDa. Las muestras fueron secadas en una centrífuga de vacío (*Speedvac*-Savant SPD 121P, Thermo) y posteriormente enviadas al SAI donde se llevó a cabo la identificación de aminoácidos libres. La identificación y cuantificación de aminoácido libre se llevó a cabo utilizando ESI*/LC/MS-Orbitrap. Previamente al análisis, los aminoácidos fueron derivatizados utilizando *EZ:faast*[™] (Phenomenex) siguiendo las indicaciones del fabricante aunque con algunas modificaciones. Brevemente, el *EZ:faast*[™] consiste en un primer paso en fase sólida seguido de la derivatización y una extracción líquido/líquido; las muestras derivatizadas se secan y se disuelven en fase móvil del HPLC y se inyectan en el sistema LC/MS.

La separación de los aminoácidos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (Thermo Scientific Accela) equipado con una columna LC *EZ:faast* AAA-MS 250x3 mm (Phenomenex, USA). Las muestras y los estándares fueron resuspendidos en 100 μ L de fase móvil de HPLC ((A) 10 mM formato de amonio en agua (B) 10mM formato de amonio en metanol; v/v) aunque solamente 10 μ L fueron inyectados en el HPLC. La separación se llevó a cabo en gradiente a una velocidad de flujo de 0,5 mL/min: tiempo = 0 min, 30% A; tiempo = 11 min, 30% A; tiempo = 25 min, 14% A; tiempo = 25,01, 30% A; tiempo = 28 min, 30% A y un tiempo inicial de equilibrado de 7 min al principio.

La detección de analitos se llevó a cabo con *Thermo Scientific LTQ-Orbitrap Discovery* trabajando en modo ESI+. Los cromatogramas se construyeron para cada ión en función de la masa/carga (m/z) con una tolerancia de 10 ppm y una presión cuatro veces mayor (m/z

361,2341 para la lisina y m/z 367,2541 para la C13-lisina ; m/z 303,2036 para la arginina y m/z 313,2119 para la C13-arginina). Los datos se analizaron utilizando el programa que controla el sistema (Xcalibur 2.0.7, Thermo Scientific, USA). La cuantificación de los analitos se llevó a cabo aplicando el método del estándar interno (homoarginina) proporcionado por el fabricante (*EZ:faast™*). Las curvas de calibración fueron de 0,025 nmol/mL a 4nmol/mL para los compuestos nativos y de 0,0025 nmol/mL a 0,4 nmol/mL para los compuestos marcados. La preparación del estándar se llevó a cabo diluyendo la solución inicial (4 nmol/mL para los compuestos nativos y 0,4 nmol/mL para los marcados) en NP40 hasta la concentración deseada. Las curvas de calibración se hicieron por duplicado (n = 2).

6.5. Transferencia e identificación de proteínas

A continuación se detalla el protocolo utilizado para el análisis de la fracción (> 3kDa).

6.5.1. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La fracción mayor de 3 kDa (aproximadamente 150 μ L) obtenida tras la separación en filtros (Amicon® Ultra-3K, Millipore) fue concentrada en una centrifuga de vacío (*Speedvac*-Savant SPD 121P, Thermo) y resuspendida en 20 μ L de tampón de carga 1X (**tabla 6**).

La separación de proteínas de acuerdo a su peso molecular se llevó a cabo mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 1.0 mm de grosor. Se utilizaron geles de 10% de acrilamida/bisacrilamida 30% (Sigma-Aldrich) (**tabla 6**). 5 μ L de cada muestra se cargaron en un gel que fue posteriormente teñido con reactivo de plata para confirmar la presencia de proteínas en cada muestra (**tabla 7**). Una vez confirmado que todas las muestras presentan proteínas, 15 μ L de cada muestra resuspendidos en tampón de carga 1X, se hirvieron durante 10 min a 100°C y se cargaron en otro gel. La electroforesis se llevó a cabo a 80 V durante 20 min en una cubeta de electroforesis (BIO-RAD) con tampón de electroforesis 1X (TEF) (**tabla 6**). El gel fue posteriormente teñido con Coomassie Brilliant blue G250 (tabla 4) y utilizado en el análisis de identificación proteica.

Composición	
Tinción de Plata	Fijar el gel 30 min en etanol:acético:agua (40:10:50) Lavar dos veces con agua Sensibilizar 1 min en 0,02% Tiosulfato sódico Lavar dos veces con agua Teñir con 0,2% nitrato de plata con 0,075% formaldehído Lavar 10 segundos con agua Revelar con 3% carbonato potásico, 0,025% formaldehído y 12,5 mg/l tiosulfato sódico. Mantener hasta observar bandas Parar el revelado con 3% Tris base, 10% acético y agua durante 30 min Lavar con agua 10 min
Comassie - Blue	0,05 g Comassie Brilliant Blue en 50 mL (25 mL metanol, 25 mL agua)

Tabla 7. Tinción de Plata y Comassie-Blue para geles de acrilamida/bisacrilamida 30%.

6.5.2. Digestión de bandas y extracción de péptidos

El gel previamente teñido con Comassie Brilliant blue G250 mostró 4/5 bandas de color azul que se correspondían con las diferentes fracciones proteicas separadas de acuerdo a su peso molecular. Cada banda fue cortada en pequeños trozos con ayuda de un bisturí y posteriormente digerida en gel siguiendo un protocolo estandarizado ¹⁵³. Las bandas se deshidrataron usando acetonitrilo (ACN, Lab-Scan, Analytical sciences), fueron reducidas con 10 mM de ditiotreitol (DTT, Fluka analytical) durante 30 min a 56°C, alquiladas con iodacetamida (IAA, Sigma-Aldrich) 50 mM, deshidratadas de nuevo con ACN y finalmente digeridas con 6,6 ng/μL de tripsina (Roche, Mannheim) en 25 mM de bicarbonato amónico ¹⁵⁴ durante 4 horas en hielo. Tras 4 horas, se retiró el exceso de tripsina y las bandas se cubrieron e incubaron con 25 mM de AmBi durante 17 h a 37°C en estufa. La extracción de péptidos de cada banda se llevó a cabo al día siguiente utilizando 50% ACN, 0,1% ácido trifluoroacético (TFA) vorteando cada banda durante 30 min y sonicando las bandas durante 5 min. La extracción se llevó a cabo tres veces. Los extractos peptídicos se juntaron y evaporaron en una centrífuga de vacío (*Speedvac*-Savant SPD 121P, Thermo). Las muestras una vez secas fueron reconstituídas en 0,1% TFA y se procedió a su limpieza de sales y su posterior concentración utilizando discos de fase reversa (Empore disk-C-18, 47 mm, 3M O Agilent Technologies) para su posterior análisis utilizando LC-MS/MS.

6.5.3. Identificación de proteínas utilizando nanoLC – MALDI-TOF/TOF

El extracto peptídico fue reconstituido en 7 μ L tampón A (0,1% TFA, 2% ACN) para ser analizado utilizando cromatografía líquida (Tempo Nano-LC, Applied Biosystems, Eksigent, Dublin) acoplada a espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF, ABSciex). 5 μ L fueron inyectados en una pre-columna (0,5 x 2 mm, Michrom Bioresources, Auburn, CA) a un flujo de 15 μ L/min durante 15 min para concentrar y desalinizar la muestra y posteriormente cargados en una nano-columna C-18 (Integrafit C18, Proteopep II, 75 μ m id, 15 cm, 5 μ m. 300 Å; New Objective, Woburn, MA, USA). Los péptidos fueron eluidos a un flujo de 350 nL / min durante 30 min y separados utilizando un gradiente lineal de 5 a 50% de tampón B (0,1% TFA, 80% ACN), mezclados con matriz α -cyano-4-hydroxycinnamic (3 mg/mL en 0,1% TFA, 70% ACN) a un flujo de 1,2 μ L/min y depositados en forma de gotas en una placa MALDI cada 15 segundos utilizando *Sun Collect MALDI Spotter/Micro-Fraction Collector* (SunChrom Wissenschaftliche Geräte GmbH, Germany). Las placas fueron analizadas en un espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF/TOF (4800 ABSciex, Framingham, MA, USA) utilizando una intensidad de láser de 3800 kV y 1500 disparos/espectro. La selección de los precursores se realizó de forma automática utilizando el método de interpretación Job-Wide (más de 12 precursores/fracción, señal-ruido 80) con una intensidad de láser de 4000 y 2000 disparos/fracción. Se llevó a cabo un segundo método Job-Wide donde se excluyeron todos aquellos precursores fragmentados previamente y con una señal-ruido de 30 para la identificación de péptidos pertenecientes a proteínas abundantes. Los péptidos presentes en cada gota de la placa MALDI se detectaron en función de la relación masa/carga (m/z ; m/z 800-4000). El péptido correspondiente a la angiotensina diluido en la matriz (3 fmol / gota) fue usado como estándar de calibración interna a una m/z de 1046,5. Para la identificación de proteínas se utilizaron los espectros de fragmentación obtenidos mediante espectrometría de masas en tándem tipo TOF/TOF. Los espectros de fragmentación se obtuvieron utilizando el programa *4000 Series Explorer*. Los datos obtenidos de los espectros de fragmentación fueron utilizados para la identificación y relativa cuantificación de las proteínas utilizando el programa Protein Pilot 3.0 (Applied Biosystems). Las búsquedas se realizaron en la base de datos humana Uniprot Swiss-Prot 2010-2012 siguiendo diferentes parámetros. Solamente proteínas con una confianza mayor del 95% ($> 1,3$ unused score) fueron consideradas como identificadas.

7. TRATAMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS Y EXPLANTES DE TEJIDO CON 1 mM DE 1-OCTANOL

Los condrocitos articulares crecidos en medio DMEM suplementado con 15% SFT y 100 µg/mL de primocín se mantuvieron hasta una confluencia del 80% aproximadamente en el frasco de cultivo celular. Una vez alcanzada esta confluencia, se sometieron a diferentes tratamientos utilizando drogas inespecíficas como 1-Octanol (Sigma-Aldrich) que bloquea de manera parcial los canales formados por Cxs. Las células se tripsinizaron y se colocaron en placas de 35 cm de diámetro para el experimento. Las células se dejaron durante 48 h en medio DMEM sin suero y 100 µg/mL de primocín en una estufa a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, a cada placa se añadió medio con/sin suero en presencia/ausencia de 1-Octanol a una concentración de 1 mM y se dejó actuar durante 17 h en estufa a 37°C y 5% de CO₂ (**Figura 18 izquierda**).

Los explantes de tejido una vez obtenidos, se colocaron en placas de 12 pocillos donde se realizó el experimento. Cada explante se puso en medio DMEM sin suero y 100 µg/mL de primocín durante 48 h. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio, se añadió a cada explante medio con/sin suero en presencia/ausencia de 1-Octanol 1 mM y se dejó actuar durante 17 h (**Figura 18 derecha**).

Transcurrido el tiempo total del experimento, las células se recogieron para citometría de flujo y expresión génica utilizando tripsina. Cada explante de cartílago fue dividido en dos: la mitad fue congelada directamente en nitrógeno líquido, almacenada a -80°C y posteriormente se utilizó para análisis de expresión génica. La mitad restante se congeló en medio Tissue-Tek[®] O.C.T.[™] Compound y fue utilizado para técnicas histológicas.

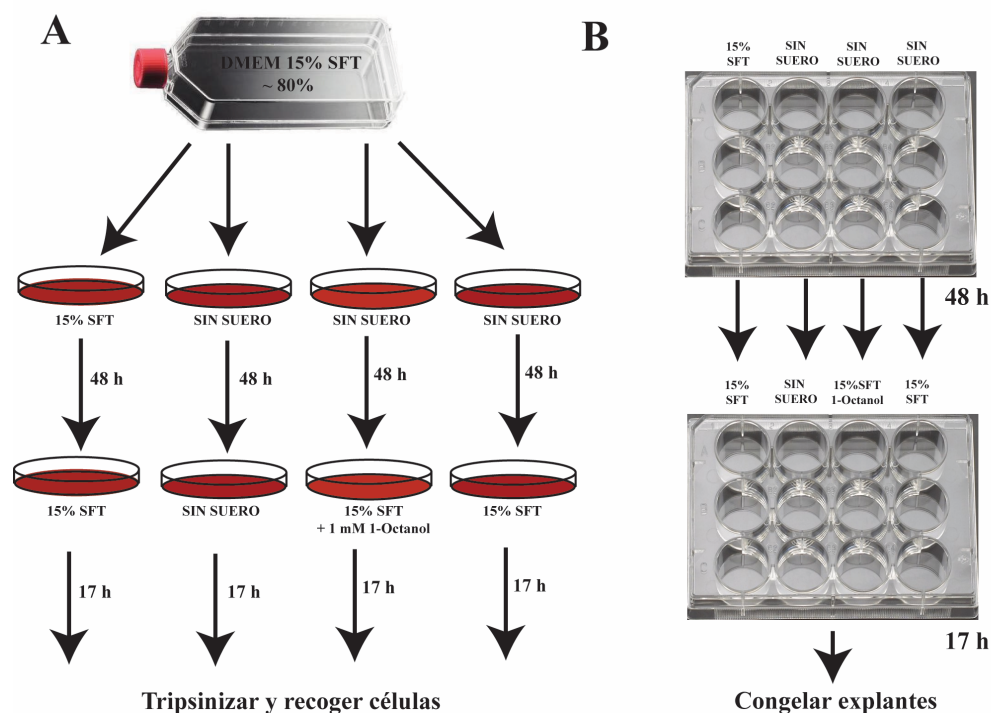


Figura 18. Condiciones experimentales para el tratamiento con 1mM de 1-Octanol. (A) Esquema para condrocitos articulares en cultivo. (B) Esquema representativo para explantes de cartílago fresco. 15% SFT (medio DMEM suplementado con 15% SFT).

7.1. Citometría de Flujo

Células crecidas en placas de 35 cm de diámetro fueron recogidas con tripsina y se pasaron a tubos de citometría, se lavaron dos veces con 1 mL de PBS pH 7 y se centrifugaron durante 15 min a 2000 rpm. Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante y las células se incubaron durante 20 min en oscuridad y temperatura ambiente con 4 mg/mL de RNAasa (Roche) y 1 mg/mL de yoduro de propidio. 1×10^4 células se analizaron en el sorter (BD FACScalibur). El canal FL-3 permitió detectar en que fase del ciclo celular se encontraba la población de células en estudio. El análisis de los datos se realizó mediante el programa informático *CellQuest Pro 5.1* (BD).

Los resultados de citometría de flujo se validaron estudiando la expresión génica mediante qPCR (apartado 3 de *Materiales y Métodos*) de genes/proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular (**tabla 5**).

8. PREDICCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS SITIOS DE GLICOSILACIÓN PARA LA Cx43: PREDICCIÓN, PURIFICACIÓN Y ESTUDIO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Los experimentos se llevaron a cabo en la Universidad de Yale (New Haven, CT, USA) bajo la supervisión del Dr. Juan Fernández de la Mora (*Mason Laboratory, Yale University*), Dr. Tukiet Lam (*W.M. Keck Biotechnology Resource Laboratory*) y la Dra. Margarita Domínguez Villar (*Associate Research Scientist in Neurology, Yale School of Medicine*) durante una estancia de 3 meses. La predicción de los potenciales sitios de glicosilación para la Cx43 se llevó a cabo utilizando el programa *GlycoEP – Prediction of glycosites in eukaryotic glycoproteins* (<http://www.imtech.res.in/raghava/glycoep/>). La secuencia de la Cx43 se introdujo en formato FASTA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/181208?report=fasta>) para la predicción de los potenciales sitios de glicosilación. Cada sitio potencial de glicosilación fue marcado en color rojo y acompañado de un valor que indica la potencialidad de sufrir glicosilación (N- y O-glicosilación). De entre ellos, en color verde se marcaron los sitios mas probables (ver resultados en la sección de resultados). Para la identificación de los sitios de glicosilación se llevaron a cabo una serie de experimentos que incluyeron una inmunoprecipitación de la Cx43 (proveniente de lisados de condrocitos primarios), precipitación de la proteína con metanol : cloroformo, digestión con urea 8 M, un tratamiento con *PNGase F* y finalmente una digestión con tripsina antes de realizar la espectrometría de masas.

La purificación de la proteína se llevó a cabo mediante inmunoprecipitación. Las células fueron resuspendidas en 1000 µL de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA pH 8, 0,5% NP-40, 1% Triton-X, 150 mM NaCl). El tampón de lisis contenía inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) y 1 mM PMSF. El lisado celular fue tratado con 50 µL de proteína G de agarosa. A continuación, las muestras se incubaron con 4 µg del anticuerpo monoclonal anti-Cx43 (SC-20, sc-6560. Santa Cruz Biotechnology) y con bolas de proteína G de agarosa a 4°C durante toda la noche en rotación. Las bolas de agarosa se lavaron 6 veces con el tampón de lisis correspondiente y finalmente se resuspendieron en un tampón que contenía 20 mM Tris, 50 mM NaCl, 1% SDS y 1mM DTT. Las muestras se calentaron durante 30 min a 37°C y posteriormente se hirvieron a 95°C durante 10 min para favorecer la separación de la proteína y las bolas de agarosa. El sobrenadante obtenido se guardó a -80°C. Como control negativo se utilizaron muestras a las que no se les añadió anticuerpo. Las muestras fueron a continuación precipitadas con una mezcla de metanol : cloroformo y posteriormente digeridas en solución con 8 M de urea. Una vez digeridas, cada muestra fue tratada con 500 U/mL de la

enzima *PNGase F* (Sigma-Aldrich; St Louis, MI, USA) durante toda la noche a 37°C. Las muestras fueron digeridas con 2,5 µg de tripsina durante 5 h a 37°C y posteriormente fueron desalinizadas usando filtros C18 (C18 microspin columns) y secadas en una centrifuga de vacío (*Speedvac*-Savant SPD 121P, Thermo). Finalmente, se añadió a cada muestra una solución que contenía 70% ácido fórmico, 0,1% TFA y se llevó a cabo el análisis en el aparato *Orbitrap Elite™ Hybrid IonTrap Mass Spectrometer*.

9. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS GLICOSILADAS Y CON ÁCIDO SIÁLICO EN POSICIÓN TERMINAL Y ENLACE α -2,3

La presencia de sialización de glicoproteínas en enlace α -2,3 fue analizada de dos formas. Por un lado se realizó un ensayo de inmunohistoquímica, como control positivo, para evaluar la presencia de podoplanina, proteína altamente sializada en enlace α -2,3, en cartílago de donantes sanos y pacientes con OA. Por otro lado, se analizó la presencia de glicoproteínas sobre explantes de cartílago que habían sido congelados a -80°C. En este análisis se utilizó una lectina MASL (*Maackia amurensis seed lectin*) marcada con una molécula fluorescente (*HiLyte Fluor TR*) donada por el Dr. Gary S. Goldberg (Rowan University, NJ USA) por requerimiento de la Dra. María D. Mayán. La lectina MASL se une específicamente a glicoproteínas que presentan ácido siálico en posición α -2,3. MASL es una lectina que se obtiene a partir de la semilla de un árbol denominado *Maackia amurensis*. La lectina fue purificada por la compañía Sentrimed (<http://www.sentrimed.com/>).

El MASL fluorescente fue preparado a una concentración final de 200 µg/mL en PBS. Cortes de 4 µm de grosor de explantes de cartílago incubados durante 20 min en oscuridad con la solución que contenía MASL; se lavaron dos veces con PBS y finalmente se fijaron con 4% formaldehído durante 4 min a temperatura ambiente. Condrocitos primarios también fueron analizados bajo estas condiciones. Las células se crecieron en cámaras de 8 pocillos hasta alcanzar confluencia y posteriormente se incubaron con MASL fluorescente siguiendo el mismo protocolo que para los explantes. Tanto los explantes como las células se analizaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 utilizando la cámara DP71 (Olympus) y los programas DP Manager y DP Controller (Olympus Biosystems Hamburg, Germany).

9.1. Ensayos de toxicidad

9.1.1. Ensayo de viabilidad celular – ensayo colorimétrico MTT

Se ha llevado a cabo este ensayo colorimétrico basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) para testar la viabilidad celular utilizando diferentes concentraciones de MASL (400 nM y 720 nM), 5 µg/mL de oligomicina y la combinación de ambos (400 nM y/o 720 nM + 5 µg/mL de oligomicina) en condrocitos articulares humanos y en la línea celular T/C-28a2. El MTT es un compuesto de color amarillo que es reducido por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa a formazán (color violeta) (**Figura 19**). La viabilidad celular fue cuantificada mediante la producción de formazán y medida a 570 nm en un lector de placas modular (NanoQuant Infinite® 200 PRO, Tecan).

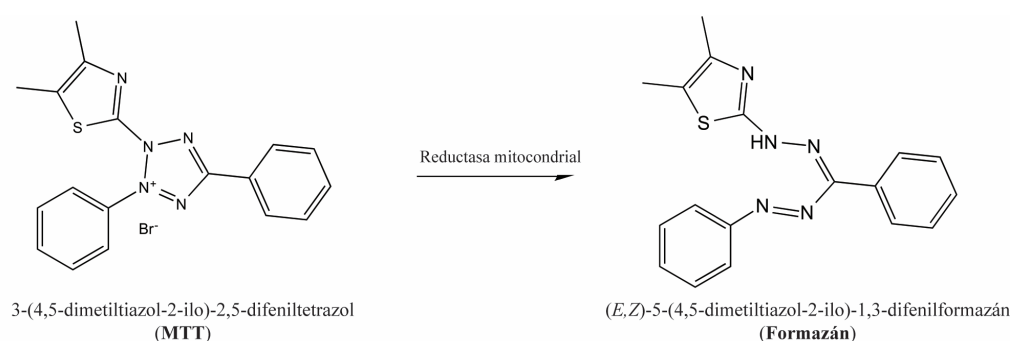


Figura 19. Reacción de formación de cristales de formazán a partir de MTT. La formación de formazán es indicativo de la viabilidad celular ya que se trata de una enzima mitocondrial.

Tanto los condrocitos articulares humanos como la línea celular T/C-28a2 se cultivaron en placa de 96 pocillos hasta una confluencia del 70%. Una vez alcanzaron la confluencia, las células se dejaron en un medio DMEM sin suero suplementado con 100 µg/mL de primocín durante 3 horas antes de comenzar el experimento. A las 3 horas, se añadió a cada pocillo la concentración correspondiente de cada uno de los tratamientos que se detallan a continuación: 400 nM MASL, 720 nM MASL, 5 µg/mL de oligomicina, 400 nM MASL + 5 µg/mL de oligomicina y 720 nM MASL + 5 µg/mL de oligomicina, células control sin tratar y se incubaron durante 1 hora a 37°C y 5% de CO₂ en estufa de cultivo celular. Cada condición se analizó por duplicado. A continuación, a cada pocillo se le añadieron 10 µL de reactivo MTT (Cell Proliferation Kit I, Roche) preparado para una concentración final de 5 mg/mL y se dejó actuar durante 4 horas. Posteriormente, la reacción fue parada tras la adición de 100 µL de la

solución solubilizadora (SDS al 10% en HCl 0.01 M). La solución solubilizadora estaba preparada para cada uno de los tratamientos con la correspondiente concentración del compuesto a testar. Se dejó actuar durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂ en estufa y oscuridad y se procedió a la medida resultante al día siguiente en un lector de placas modular a 570 nm (NanoQuant Infinite® 200 PRO, Tecan).

9.1.2. Ensayo de adhesión celular

Se utilizaron condrocitos articulares humanos, la línea celular T/C-28a2 y células en cultivo primario procedentes de la membrana sinovial (sinoviocitos) bajo diferentes condiciones: sin MASL, 400 nM MASL, 720 nM MASL. Se utilizó el siguiente *kit*: CytoSelect™ 48-Well Cell Adhesion Assay (Fibrinogen-Coated, Colorimetric Format) (Cell Biolabs, INC) para realizar este ensayo. Las células fueron crecidas en DMEM suplementado con 15% SFT y 100 µg/mL de primocín hasta una confluencia del 70%. A continuación se tripsinizaron y se resuspendieron dos veces con DMEM sin suero. Se colocaron en placas de 48 pocillos con base recubierta de fibrinógeno para realizar el ensayo. Se utilizaron 150 µL de células por pocillo y en medio sin suero con el correspondiente tratamiento. Se incubaron a 37°C durante 90 min. Posteriormente se retiró el medio y cada pocillo se lavó 2 veces con PBS. Las células adheridas se tiñeron con 250 µL de *Cell Stain Solution* (Cell Biolabs, INC) y se incubaron 10 min a temperatura ambiente. Se eliminó el exceso de tinción haciendo varios lavados con agua. A continuación, a cada pocillo se añadieron 200 µL de Cell Extraction Solution (Cell Biolabs, INC) y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Se recogieron 150 µL de cada pocillo y finalmente la capacidad de adhesión fue medida a 560 nm en un lector de placas modular (NanoQuant Infinite® 200 PRO, Tecan). Como control negativo se utilizaron células crecidas sobre pocillos con BSA. Se realizó cada experimento por duplicado.

9.1.3. Ensayo de proliferación celular

La proliferación celular fue evaluada utilizando CytoSelect™ Wound Healing Assay (Cell Biolabs). Se estudió el crecimiento y proliferación de condrocitos articular humanos así como también de la línea celular T/C-28a2. Las células fueron crecidas en medio DMEM suplementado con 15% SFT y 100 µg/mL de primocín hasta alcanzar confluencia en placas de 24 pocillos que contenían un inserto que generaba un hueco de 0,9 mm. Una vez alcanzada la confluencia, el inserto fue retirado y las células se pusieron en contacto con un medio DMEM suplementado con 1% SFT y 100 µg/mL de primocín que contenía 720 nM y 400 nM

de MASL (**Figura 20**) durante 24 horas para las T/C-28a2 y 10 días para los condrocitos primarios aislados de cartilago. Transcurrido ese tiempo, el análisis se llevó a cabo en un microscopio invertido (Nikon Eclipse Ti) utilizando NIS-Elements como programa de análisis.

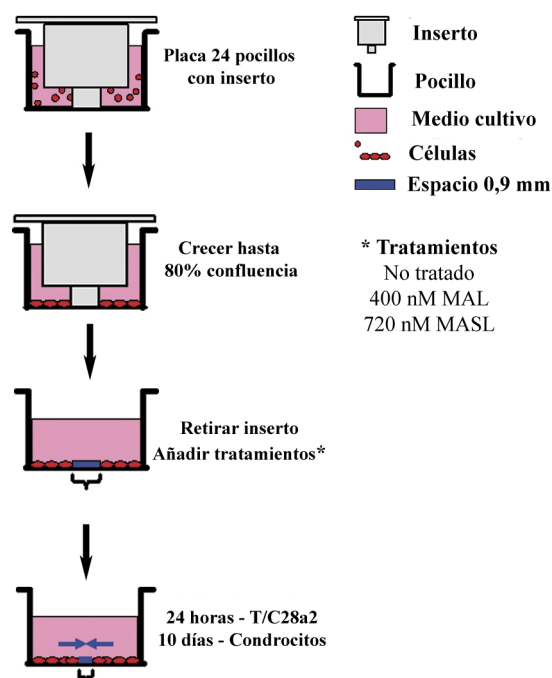


Figura 20. Ensayo de proliferación celular. Esquema donde se representan todos los pasos seguidos para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de MASL sobre el crecimiento celular en condrocitos articulares y la línea celular T/C-28a2. Imagen obtenida y adaptada de: *instrucciones del fabricante Cell Biolabs*

9.2. Detección de especies reactivas de oxígeno

La formación de especies reactivas de oxígeno (ERO o ROS por *reactive oxygen species*) fue evaluada utilizando citometría de flujo (BD FACScalibur™, BD Bioscience) midiendo la intensidad de fluorescencia del DCF (2,7-diclorofluoresceína) que se trata del producto de oxidación del DCFH-DA (2,7-diclorodihidrofluoresceína). Los condrocitos primarios y la línea celular T/C-28a2 fueron crecidos en placas de 24 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 80%. A continuación las células se lavaron con un medio DMEM sin suero y fueron incubadas en este medio durante 3 horas, previamente a la incubación con DCFH-DA (Sigma). Se incubaron durante 45 min a 37°C en oscuridad. Tras los 45 min, las células fueron inmediatamente incubadas en presencia de diferentes concentraciones de MASL (200, 400 y 720 nM) en presencia/ausencia de 5 µg/mL de oligomicina durante 1 hora. Las células

se tripsinizaron y se lavaron con PBS antes de ser analizadas por citometría. 1×10^4 células fueron analizadas para las T/C-28a2 y 5000 en el caso de condrocitos articulares primarios.

10. ESTUDIO DEL EFECTO DE MASL EN UN MODELO *IN VIVO* UTILIZANDO RATONES BALB/C

El efecto de MASL *in vivo* se analizó utilizando ratones: *Mus musculus* cepa BALB/c. Los experimentos se llevaron a cabo teniendo en cuenta las tres erres de experimentación animal: reemplazamiento, reducción y refinamiento.

La metodología relacionada con esta sección no pueden describirse por estar en proceso de negociación y corrección de una patente PCT registrada en Estados Unidos (USPTO).

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como Media \pm S.E.M. Los datos fueron analizados con el programa informático GraphPad PRISM® versión 5.0a.

IV. RESULTADOS

1. COMUNICACIÓN CELULAR EN CARTÍLAGO ARTICULAR

Algunos de los resultados que se describen a continuación han sido publicados en las siguientes revistas indexadas (ver ANEXOS): *American Journal of Pathology*, *Annals of the Rheumatic Diseases* y en *Osteoarthritis and Cartilage*.

1.1. Estudio de la presencia de proyecciones citoplasmáticas en condrocitos articulares procedentes de cartílago de *Sus scrofa* y cartílago humano

Se han utilizado secciones de cartílago articular procedentes de *Sus scrofa* y cartílago procedente de donantes del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC, Xerencia de Xestión Integrada A Coruña, XXIAC) (CAEIG: 2012/094 - PI13/00591). El cartílago articular de *Sus scrofa*, a diferencia del cartílago humano de adultos, contiene mayor número de condrocitos, lo que facilita su estudio utilizando técnicas de microscopía. Las secciones de cartílago fueron procesadas y congeladas utilizando Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound e isopentano en nitrógeno líquido según se detalla en el apartado de *Materiales y Métodos* para ser utilizadas en diferentes técnicas histológicas. Una serie de preparaciones de *Sus scrofa* utilizando la tinción con hematoxilina de Gill III y microscopía óptica, sugirieron la presencia de proyecciones citoplasmáticas que atraviesan la MEC y que físicamente conectan con células localizadas en lagunas distantes (**Figura 21A**).

A continuación, se utilizaron secciones procedentes de cartílago articular humano con el fin de intentar detectar este tipo de proyecciones citoplasmáticas en cartílago humano. Como se refleja en la **figura 21B**, se detectaron proyecciones citoplasmáticas en los condrocitos del cartílago articular procedente de muestras humanas. Además, estas proyecciones fueron positivas para Sox9 y colágeno tipo II (Col2A) lo que fue detectado tras realizar técnicas de IHQ sobre secciones de cartílago humano y los anticuerpo anti-Sox9 y anti-Col2A (**Figura 21B**).

Los resultados obtenidos utilizando microscopía óptica fueron confirmados mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). En este caso, utilizamos tanto secciones de cartílago procedentes de *Sus scrofa* como secciones de cartílago humano que fueron procesadas de acuerdo a los requerimientos para MEB según ha sido detallado en *Materiales y Métodos*. Las imágenes obtenidas confirmaron que las proyecciones observadas mediante microscopía óptica se corresponden con brazos o extensiones del citoplasma de los condrocitos (**Figura 22A y 22B**). Cada condrocito presentó al menos dos extensiones

citoplasmáticas (fechas amarillas). Estas proyecciones presentaron un tamaño comprendido entre 5 – 150 micrómetros (μm) de longitud y 200 nanómetros (nm) de ancho como se pudo estimar a partir de las imágenes obtenidas de microscopía óptica y MEB (**Figura 22C**).

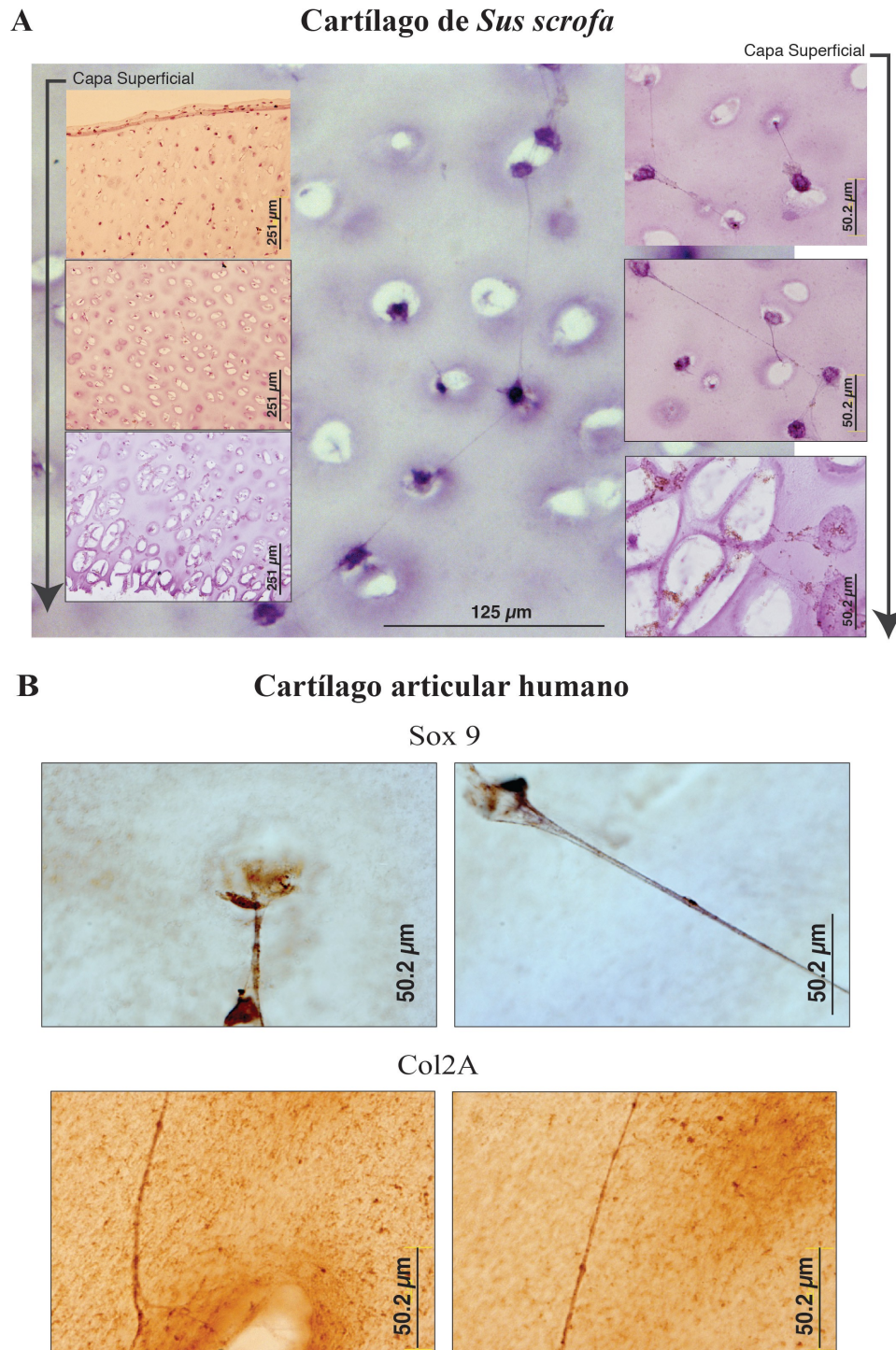


Figura 21. Proyecciones citoplasmáticas en cartílago articular observadas mediante microscopía óptica. (A) La hematoxilina de Gill III reveló la presencia de proyecciones citoplasmáticas en cartílago de *Sus scrofa* (3 meses de edad). Las secciones de cartílago fueron analizadas desde la capa superficial hacia la profunda en contacto con el hueso subcondral (flecha negra). (B) Ensayos de IHQ en cartílago articular humano utilizando anti-Sox9 y anti-Col2A. La presencia de ambas proteínas se detectó en color marrón. En el caso del Col2A, se detectó positividad en la matriz y en las proyecciones citoplasmáticas. Sox9 se detectó principalmente en el citoplasma celular y en las proyecciones observadas.

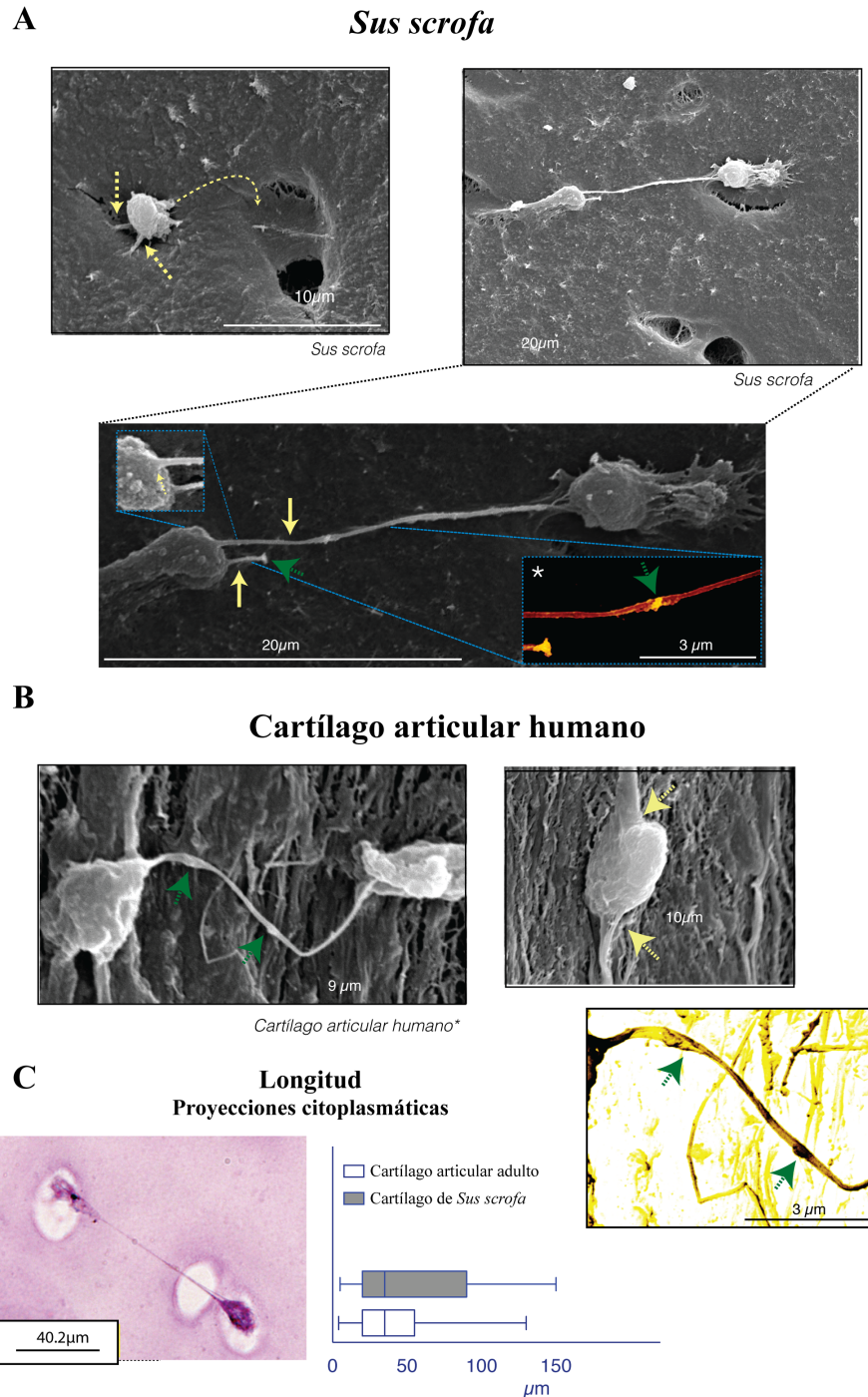


Figura 22. La MEB confirmó la presencia de brazos o extensiones del citoplasma de los condrocitos presentes en cartilago articular. Los condrocitos de *Sus scrofa* (A) y del cartílago articular humano (B) presentaron al menos dos extensiones citoplasmáticas. Las flechas amarillas señalan las proyecciones detectadas. Utilizando esta técnica, los condrocitos se observados en color gris claro mientras que la MEC se observó de color gris oscuro (imágenes originales). Las imágenes de color fueron obtenidas por modificación homogénea del color utilizando herramientas del programa Adobe Photoshop. Las flechas verdes indican un posible punto de conexión entre dos proyecciones citoplasmáticas o bien la presencia de posibles vesículas u otros componentes que alteran el color de la imagen obtenida. (C) Las proyecciones presentan un tamaño comprendido entre 5 – 150 µm de longitud y 200 nm de ancho. Las imágenes fueron obtenidas utilizando el microscopio de barrido *Jeol JEM 6400* y analizadas utilizando el programa *Inca Energy V.200*.

1.2. Expresión de conexinas en condrocitos articulares

A pesar de las limitaciones, el cultivo en monocapa de condrocitos articulares humanos (y de modelos animales) ha servido como herramienta para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la homeostasis y función del cartílago articular. Los condrocitos aislados de rodillas (cartílago procedente de cóndilos y platillos de la articulación sinovial) y caderas (cartílago procedente de la cabeza femoral de la articulación femoral) se cultivaron a 37°C y 5% CO₂ en un incubador durante 2 - 5 semanas hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente el 80%. Para comprobar su fenotipo, se estudió mediante IHQ la presencia de marcadores del fenotipo celular como es el caso de Col2A, que resultó positivo en todos los estudios realizados (**Figura 23A**). Con el paso del tiempo, los condrocitos adoptan un aspecto más fibroblástico y por lo tanto la síntesis de colágeno tipo II disminuye, y aumenta la síntesis de otros tipos de colágenos como colágeno tipo I. Los resultados presentados en la **figura 23A** sugieren que los condrocitos en estas condiciones de cultivo mantuvieron su fenotipo original.

Varios autores detectaron que condrocitos de origen animal en cultivo expresan Cxs, en concreto Cx43¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Sin embargo, estos y otros autores fueron incapaces de explicar por qué células que no se conectaban físicamente entre sí expresaban este tipo de proteínas. Por esta razón, estos autores enfocaron sus trabajos de investigación al estudio de la función de los hemicanales y no al de las uniones comunicantes.

Tras los resultados obtenidos en nuestro grupo, donde demostramos que los condrocitos en cartílago articular presentan proyecciones citoplasmáticas que atraviesan la MEC y conectan físicamente con células localizadas en lagunas distantes, decidimos estudiar si los condrocitos articulares de muestras de donantes sanos (adultos) expresaban diferentes tipos de Cxs, entre ellas la Cx43.

Mediante ensayos de qPCR analizamos la expresión de los genes para la conexina 43 (Cx43), conexina 45 (Cx45), conexina 46 (Cx46) a nivel de ARN primario (intrón-exón; transcritos primarios) y mensajero (exón-exón, ARNm); la conexina 26 (Cx26), conexina 40 (Cx40) y conexina 32 (Cx32) fueron analizadas a nivel de expresión del mensajero (exón-exón, ARNm). Como se puede observar en la **figura 23B**, los condrocitos de cartílago articular adulto de donantes sanos expresan altos niveles de Cx43. Los niveles son más elevados en el caso del mensajero (Cx43m) que para el transcrito primario (Cx43p). Detectamos también expresión de Cx45 a nivel de mensajero y primario. A pesar de haber detectado ARN mensajero para la Cx45, no fuimos capaces de detectar la proteína mediante técnicas de IHQ

(Figura 23C). La secuencia de los cebadores utilizados se detalla en la **tabla 5** (ver *Materiales y Métodos*).

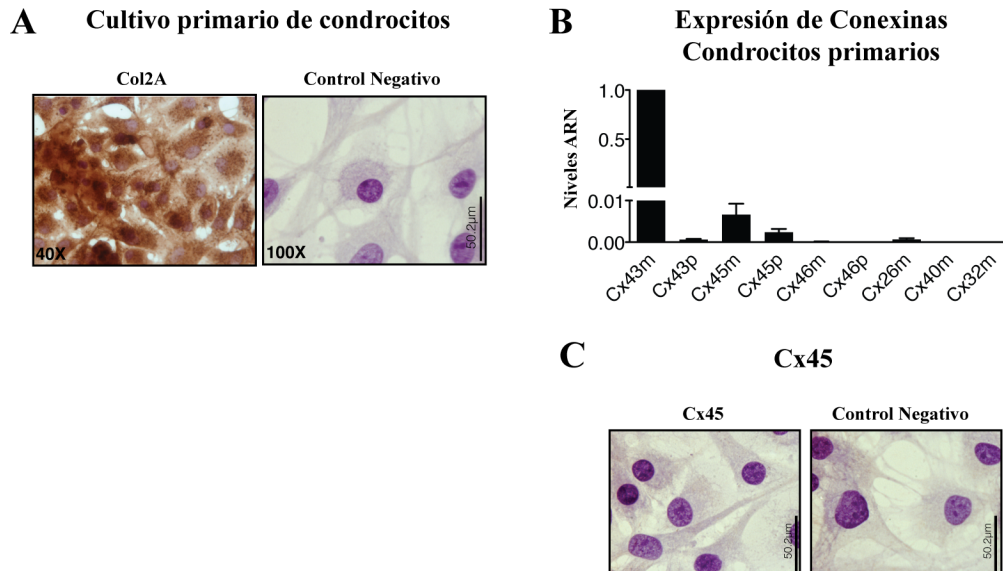


Figura 23. Análisis de la expresión de conexinas en condrocitos articulares humanos en cultivo primario. (A) La IHQ para Col2A contrateñida con hematoxilina-eosina reveló que los condrocitos procedentes de cartílago articular humano mantuvieron un fenotipo estable en cultivo en monocapa. Debido a la contratinción utilizada los núcleos celulares se detectan en color violeta oscuro y los citoplasmas en color violeta claro (B) Análisis de la expresión génica mediante qPCR de ARN aislado de cartílago articular de donantes sanos (n = 6). Los datos están normalizados utilizando HPRT1 (hipoxantina fosforibosiltransferasa 1) y se representan respecto a los niveles de expresión de la Cx43m (ARN mensajero de la Cx43). Los datos se muestran como Media \pm S.E.M. (C) IHQ contrateñida con hematoxilina-eosina, utilizando un anticuerpo anti-Cx45 y condrocitos primarios. El control negativo, sin anticuerpo primario, se muestra a la derecha de la imagen.

1.2.1. Estudio de la expresión y función de la conexina 43 en condrocitos y cartílago articular de donantes sanos

Como se puede observar en la **figura 24A** los condrocitos de cartílago articular adulto expresan altos niveles de Cx43 en relación con la expresión del gen basal HPRT1. Además, el uso de técnicas de Western-blot confirmó que los condrocitos presentan altos niveles de Cx43, al ser comparados con una línea celular que expresa Cx43⁸⁴ (**Figura 24B**).

Con el objetivo de estudiar la localización de la proteína en la célula se utilizaron técnicas de IHQ. Los condrocitos procedentes de donantes sanos, se crecieron en cámaras de 8 pocillos hasta alcanzar confluencia del 80%. La localización de la Cx43 fue analizada utilizando el anticuerpo monoclonal anti-Cx43. Como se puede comprobar en la **figura 24C**, la Cx43 se

localiza principalmente en el citoplasma de las células o entre dos células adyacentes, así como también en el margen del núcleo y del citoplasma.

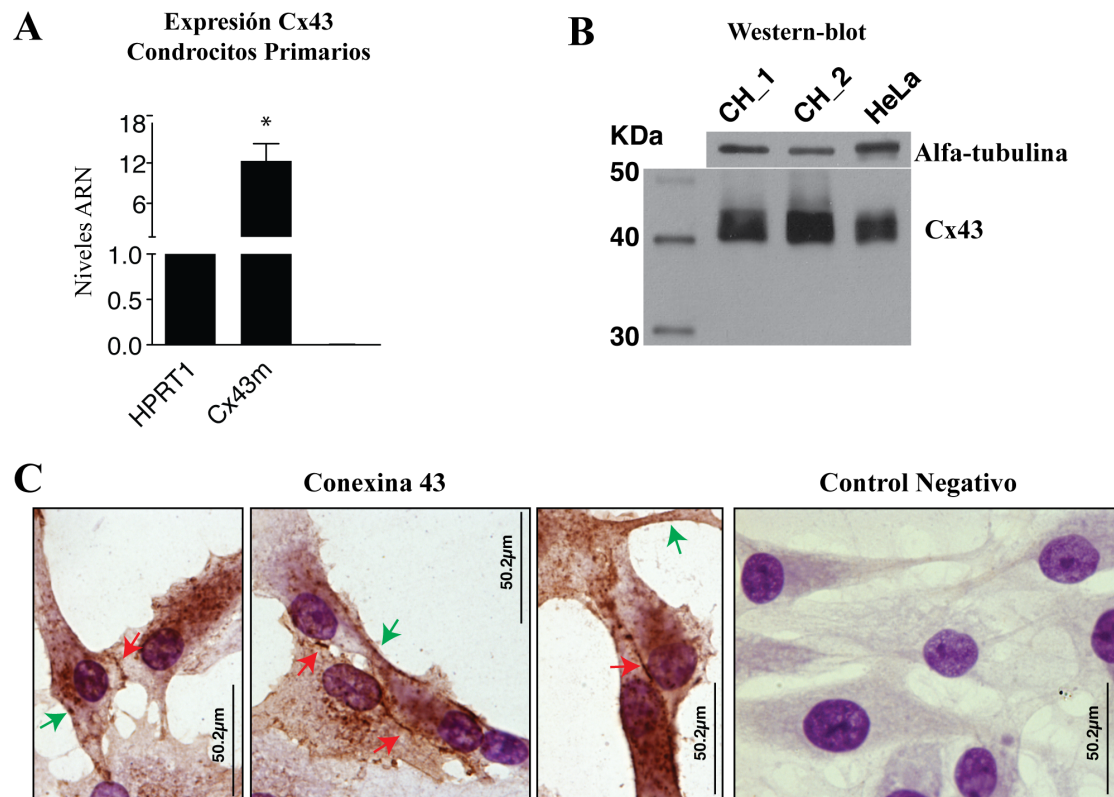


Figura 24. Expresión de la Cx43 en cultivo primario. (A) Expresión génica de HPRT1 y Cx43 (ARN mensajero) mediante qPCR y procedentes de donantes sanos. Los datos están normalizados frente a HPRT1. Los datos se presentan como Media \pm S.E.M., $n = 4$ * $p < 0.05$; test de Mann-Whitney: HPRT1 frente a Cx43m, y HPRT1 frente a Cx43p. (B) Western-blot utilizando un anticuerpo anti-Cx43. Las muestras utilizadas fueron; condrocitos de dos donantes sanos (CH1 y CH2) y una línea celular control de expresión de la proteína (HeLa Cx43H10). (C) IHQ utilizando el anticuerpo monoclonal anti-Cx43 y contratinción con Hematoxilina de Gill III. Como se observa en el control negativo esta técnica, la contratinción permite diferenciar el núcleo (púrpura) del citoplasma (rosa). Se detectó positividad para Cx43 en el margen del citoplasma (flechas verdes) y en la membrana plasmática de células en contacto (flechas rojas), además de en diferentes localizaciones citoplasmáticas, principalmente alrededor del núcleo.

Los resultados obtenidos para condrocitos en cultivo, nos llevaron a trasladar los experimentos a explantes de cartílago congelado. El ARN de los explantes de cartílago se aisló según el protocolo mencionado en *Materiales y Métodos*. Mediante ensayos de qPCR demostramos que en cartílago articular adulto, los condrocitos expresan Cx43 y detectamos tanto ARNm y como ARN del transcripto primario (sin procesar) (**Figura 25A**), a diferencia de los condrocitos en cultivo donde sólo detectamos ARNm (**Figura 24A**).

La localización de la Cx43 en las diferentes capas del cartílago se muestra en la **figura 25B**. Para realizar estos ensayos llevamos a cabo una IHQ utilizando el anticuerpo monoclonal anti-Cx43 contrateñido con hematoxilina de Gill III. La **figura 25B** demuestra que la Cx43 presenta una distribución homogénea en todas las capas del cartílago; además puede observarse que esta proteína se localiza mayoritariamente en el margen de las células o como puntos positivos alrededor de la laguna que ocupa el condrocito en la matriz.

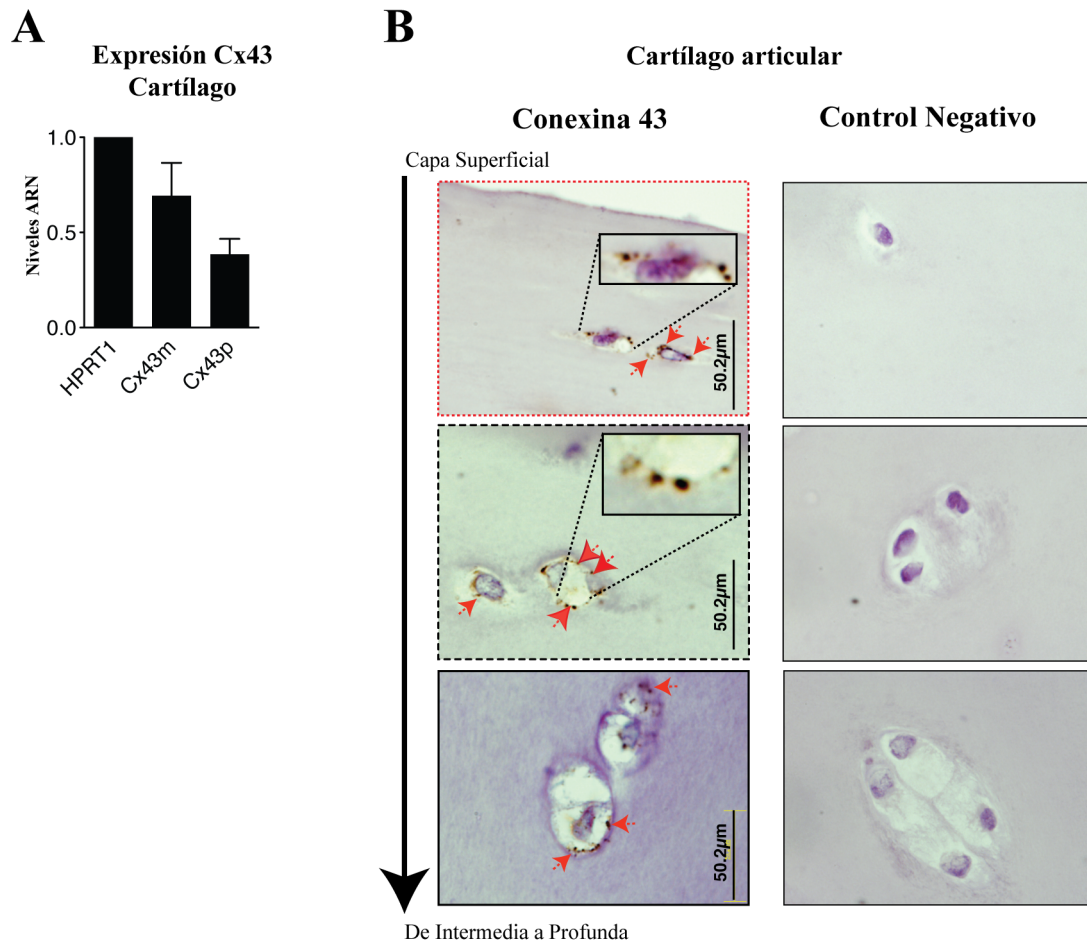


Figura 25. Análisis de la expresión de Cx43 en explantes de cartílago articular humano. (A) Expresión génica de la Cx43 en explantes de cartílago mediante qPCR. Los resultados obtenidos se representan como Media \pm S.E.M., $n = 4$, $p < 0.05$; test Mann-Whitney. (B) IHQ utilizando el anticuerpo anti-Cx43. El cartílago mostrado en esta figura se corresponde con un donante sano. Dentro de cada imagen, las flechas rojas muestran los puntos positivos.

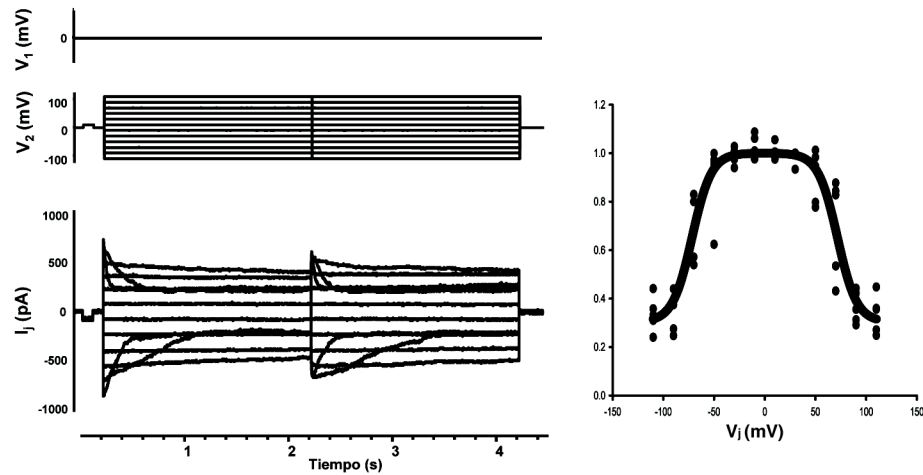
1.2.2. Estudio de la funcionalidad de los canales de conexinas en condrocitos humanos

Para estudiar si la Cx43 que expresan los condrocitos es capaz de formar canales funcionales, utilizamos la técnica denominada *dual voltage-clamp*, ya mencionada en *Materiales y Métodos*. Estos experimentos se realizaron en colaboración con Peter Brink y Virgin Valiunas de la *Stony Brook University* (NY, USA). Los resultados obtenidos mostraron el patrón de voltaje típico de los canales de conexinas formados exclusivamente por Cx43 (**Figura 26A**). Además se comprobó que los condrocitos de donantes sanos, son capaces de intercambiar moléculas como el Lucifer Yellow (LY) (**Figura 26B**). El LY es una molécula utilizada para estudiar la funcionalidad de los canales de conexinas porque es capaz de ser intercambiada a través de las uniones comunicantes. Además, es una molécula fluorescente e impermeable, de modo que cuando es inyectada en el interior de una célula no puede salir al medio exterior.

Utilizando la tinción con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para secciones de cartílago articular de *Sus scrofa* (**Figura 27A**), inesperadamente observamos fluorescencia positiva en las proyecciones citoplasmáticas. Las imágenes presentadas en la **figura 27A** corresponden a imágenes sobreexpuestas, con el fin de poder ser mostradas en una figura, sin embargo, puede observarse la positividad para DAPI de forma específica en el núcleo y en las proyecciones citoplasmáticas y no en la matriz del cartílago. La imagen de color se corresponde con la imagen original sobreexpuesta y obtenida en el microscopio Nikon Eclipse Ti utilizando el programa NIS-Elements. A la derecha, se muestra la imagen tratada de forma homogénea con tonos negro-gris. El hecho de observar positividad para DAPI en las proyecciones citoplasmáticas, nos llevó a pensar que los condrocitos de cartílago podrían estar intercambiando pequeñas moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ARN pequeños de interferencia (ARNip) o micro ARN (miARN)). Para confirmar si los condrocitos de cartílago adulto podrían intercambiar pequeñas moléculas de ácidos nucleicos, se diseñaron oligonucleótidos fluorescentes de 12 nucleótidos de tamaño y se inyectaron en una célula con una micropipeta para observar el intercambio entre células en contacto. Como se puede ver en la **figura 27B**, durante 12 minutos se observó transferencia de la molécula fluorescente a la célula en contacto.

A

Dual voltage-clamp en condrocitos primarios



B

Transferencia de Lucifer Yellow en condrocitos primarios

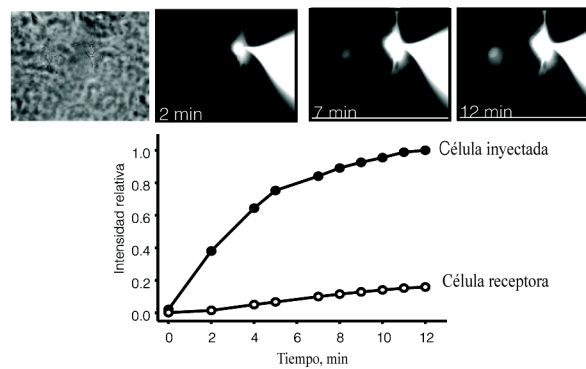


Figura 26. Estudio de la funcionalidad de los canales de conexinas en condrocitos humanos. (A) Los condrocitos se encuentran eléctricamente acoplados por canales dependientes de voltaje. En la imagen se muestra el patrón de voltaje obtenido tras la técnica de *dual-voltage clamp* que se corresponde con el patrón típico de canales funcionales formados exclusivamente por Cx43. (B) Transferencia de LY entre condrocitos en contacto. Una célula fue inyectada con una solución que contenía LY. El intercambio de LY fue monitorizado a los 2, 7 y 12 min tras la inyección. En la gráfica se representa el tiempo frente a la intensidad relativa de fluoróforo para la célula inyectada (puntos negros) y para la receptora (puntos blancos).

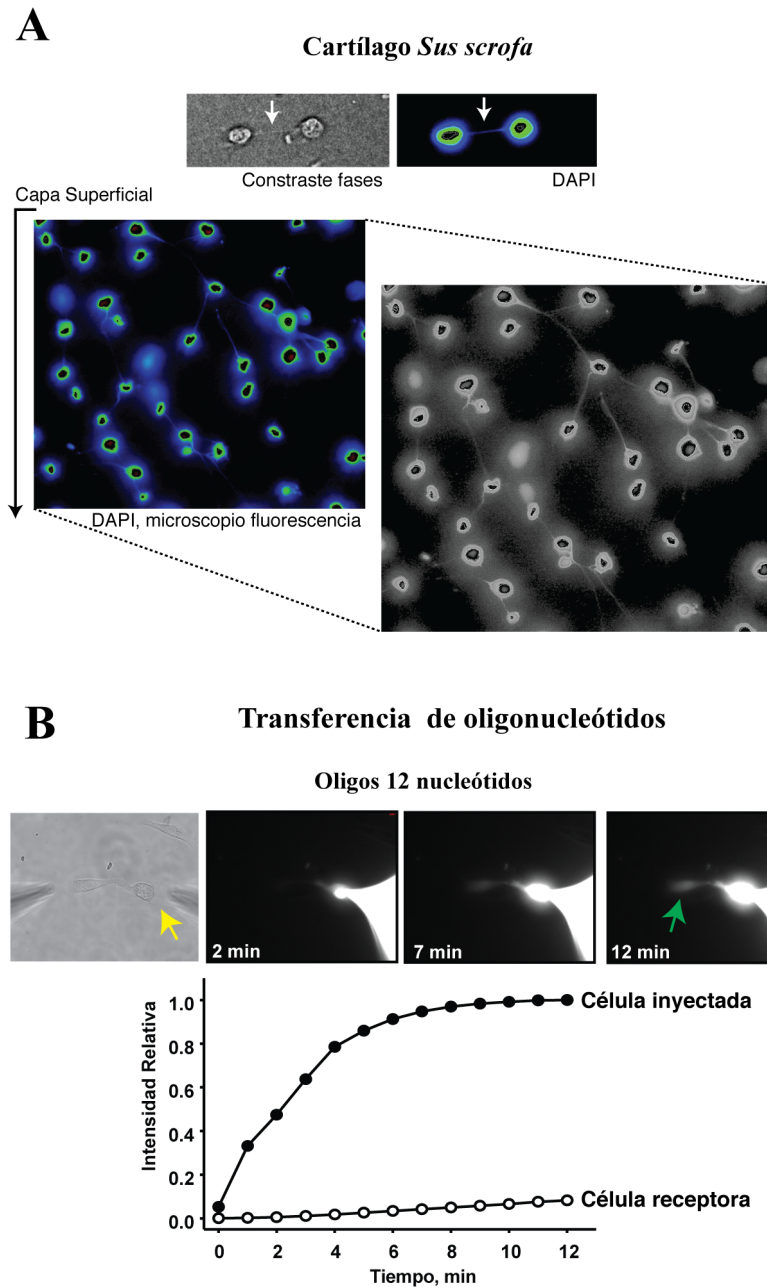


Figura 27. Transferencia de oligonucleótidos entre condrocitos en contacto. (A) Tinción de secciones de cartílago de *Sus scrofa* con DAPI. Las imágenes muestran fluorescencia positiva para DAPI en las proyecciones citoplasmáticas. Las imágenes mostradas están sobreexpuestas. Arriba se muestra una imagen obtenida por contraste de fases y la misma por fluorescencia por tinción con DAPI (B) Transferencia del oligonucleótidos marcados con fluorescencia (ver *Materiales y Métodos*) entre condrocitos primarios aislados de cartílago humano. El oligonucleótido fluorescente fue inyectado en una célula utilizando una micropipeta (imagen izquierda). La transferencia fue monitorizada durante 12 minutos y las imágenes fueron captadas pasado 2, 7 y 12 minutos tras la inyección. Los resultados demuestran incremento de fluorescencia de la células receptora a lo largo del tiempo. La gráfica muestra la intensidad de la fluorescencia frente al tiempo para la célula inyectada (círculos negros) como para la receptora (círculos blancos).

1.2.3. Estudio de la formación de hemicanales funcionales

La posibilidad de que los condrocitos articulares humanos formen hemicanales que ponen en contacto a la células con la MEC fue analizada utilizando un ensayo donde los condrocitos crecidos en placas de 6 pocillos se pusieron en contacto con LY que no es capaz de atravesar la membrana plasmática, por lo que los condrocitos solo pueden captarlo a través de los canales de membrana. Ver en *Materiales y Métodos* el protocolo utilizado. La **figura 28** muestra los resultados obtenidos para este ensayo utilizando la línea celular T/C-28a2 y condrocitos primarios en cultivo. Como puede observarse en las imágenes obtenidas, tanto los condrocitos primarios como la línea celular T/C-28a2 captaron altas cantidades de LY sugiriendo la presencia de hemicanales (**Figura 28A**).

Recientemente se ha publicado que unas proteínas denominadas panexinas son capaces de formar hemicanales con características similares a los canales formados por conexinas¹⁵⁸. Decidimos por tanto, analizar la expresión génica de los diferentes tipos de panexinas en condrocitos articulares humanos así como en la línea celular T/C-28a2 (**Figura 28C**). Los cebadores utilizados se detallan en la **tabla 5** (ver *Materiales y Métodos*). La qPCR demostró que condrocitos en cultivo expresan panexinas (PANX) ; panexina 1 y panexina 2. Utilizando esta metodología no se detectó panexina 3. Los niveles de expresión de la PANX1 podrían compararse a los niveles de expresión detectados para la Cx43 por lo que no podríamos descartar que algunos de los hemicanales pudiesen estar formados por panexinas. De hecho la presencia del péptido mimético GAP27 que se une a la Cx43, no redujo los niveles de captación de LY en las células estudiadas (**Figura 28B**).

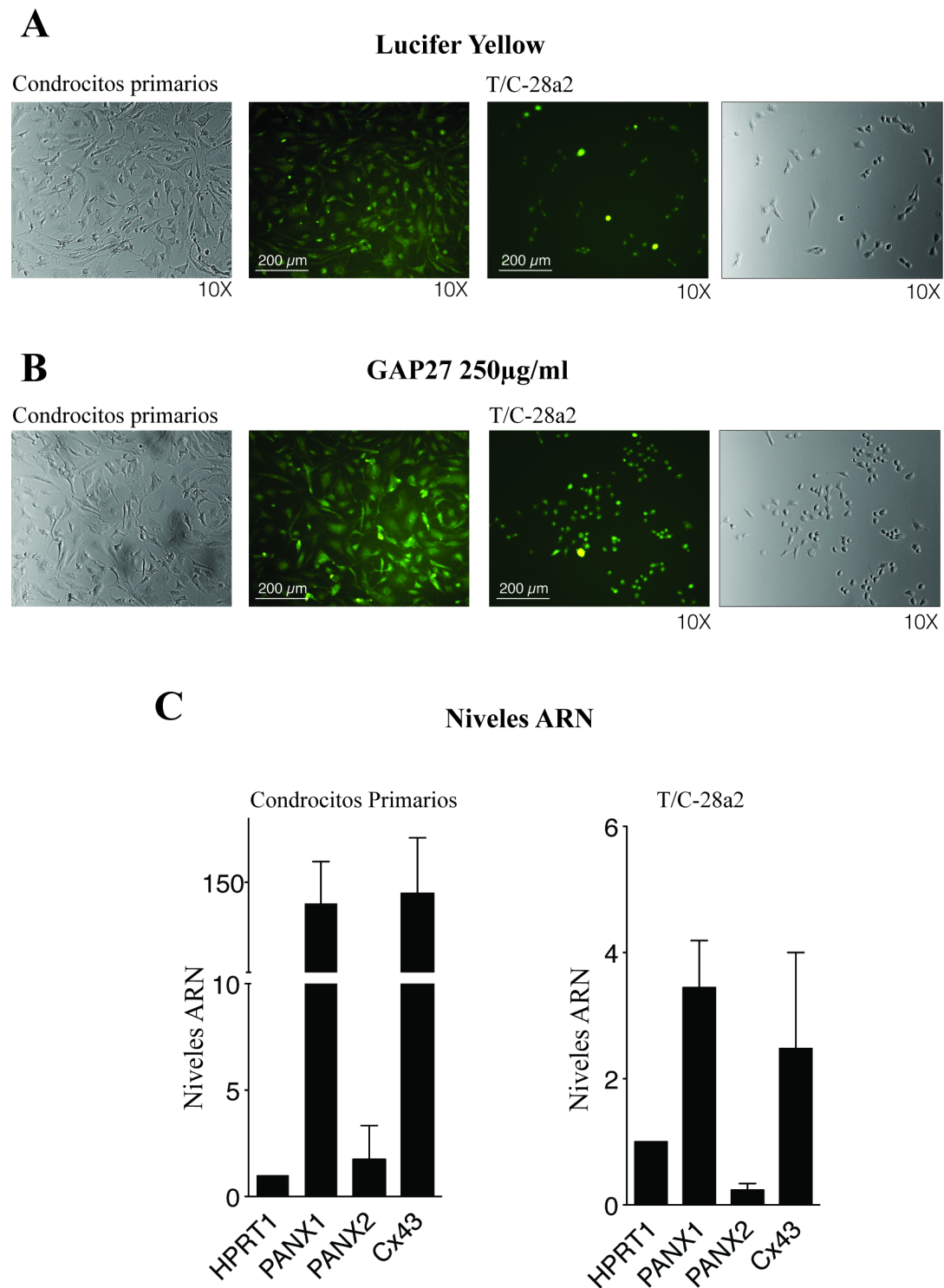


Figura 28. Presencia de hemicanales en condrocitos primarios y en la línea celular T/C-28a2. (A) El ensayo de hemicanales utilizando LY en condrocitos primarios y en la línea celular T/C-28a2 mostró la presencia de hemicanales funcionales. (B) Fotos obtenidas tras repetir el ensayo de hemicanales pero incubando las células con 250 µM del péptido mimético GAP27 durante 1 h (condrocitos primarios y la línea celular T/C-28a2). (C) Análisis de la expresión de PANX (PANX1, PANX2), Cx43 y HPRT1 en condrocitos primarios y la línea celular T/C-28a2 mediante qPCR. Los datos se presentan relativos a HPRT1 y como Media \pm S.E.M., n = 2.

1.3 Función metabólica de los canales de conexinas

1.3.1. Estudio del intercambio de nutrientes esenciales entre condrocitos articulares humanos: transferencia de glucosa

La capacidad de los condrocitos para intercambiar glucosa fue estudiada utilizando una molécula fluorescente de glucosa denominada 2-(N-(7-Nitobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxiglucosa (2-NBDG). Una célula (célula donante) fue inyectada utilizando una micropipeta cargada con la solución que contenía 1 mM de 2-NBDG y se observó la transferencia intracelular de la glucosa a lo largo del tiempo. Los resultados se muestran en la **figura 29A**. Las imágenes muestran la transferencia homogénea de glucosa (2-NBDG) entre las células en contacto al cabo de 22 y 35 minutos.

Utilizando el ensayo de electroporación denominado *InSitu Porator* descrito en el apartado de *Materiales y Métodos*, confirmamos que la transferencia de glucosa fluorescente ocurre a través de los canales de conexina. En este ensayo se han utilizado cámaras de 8 pocillos especiales para la electroporación. Cada pocillo consta de dos regiones que a su vez se dividen en dos zonas separadas por un electrodo transparente (marcado en negro en la **figura 29B**). El electrodo determina el eje de electroporación. La zona comprendida entre los electrodos se corresponde con la zona electroporada; mientras que la zona de los pocillos mas cerca de los extremos se corresponden con la zona no electroporada. Los condrocitos crecidos en la zona electroporada, captaron la glucosa fluorescente añadida al medio; mientras que las células localizadas en la zona no electroporada sólo podían captar la glucosa fluorescente a través de los canales de conexinas. Después de la electroporación en presencia de una solución que contenía glucosa marcada, y lavados correspondientes, los condrocitos primarios mostraron un gradiente de glucosa desde la zona electroporada (borde de electroporación) hasta la zona no electroporada (**Figura 29C**). La cuantificación se llevó a cabo contando el número de células positivas, que presentan fluorescencia, desde el borde de electroporación. Los resultados se muestran relativos al número de células que forman la línea de electroporación. En la **figura 29D** se muestran los resultados de esta cuantificación. Se utilizó como control una línea celular de pulmón (A549) que presenta canales de conexinas no funcionales. En este caso, no se detectó transferencia de glucosa entre células en contacto desde el borde electroporado al no electroporado. Del mismo modo, utilizamos el péptido mimético GAP27 que parcialmente inhibe la actividad de la Cx43. Los resultados mostrados en la **figura 29C** y representados en el gráfico de la **figura 29D** demostraron que el tratamiento con 250 μ M de GAP27 durante 1h redujo significativamente la capacidad de los

condrocitos para intercambiar glucosa. Estos resultados sugieren que el intercambio de glucosa ocurre a través de canales de Cx43.

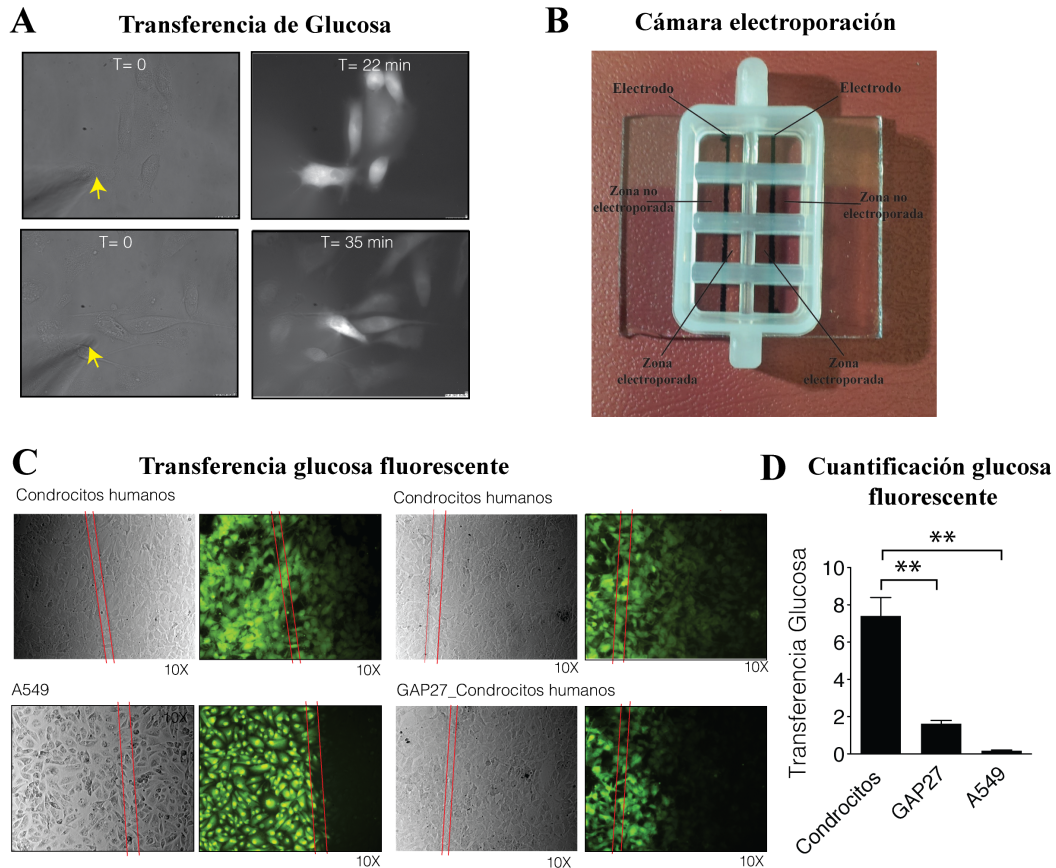


Figura 29. Transferencia directa de glucosa entre condrocitos en contacto. (A) La glucosa fluorescente (2-NBDG) fue introducida en una célula con una micropipeta conteniendo una solución de 1 mM de 2-NBDG (marcada con una flecha amarilla). La transferencia al resto de células fue monitorizada y las imágenes fueron obtenidas a los 22 y 35 minutos tras la inyección. (B) Esquema de la organización de una cámara de electroporación. Se observan los electrodos en color negro. La zona comprendida entre los electrodos se corresponde con la zona electroporada, mientras que los extremos de la cámara son la zona no electroporada. (C) Ensayo de electroporación. Las células fueron electroporadas en presencia de 1 mg/mL de glucosa fluorescente (2-NBDG). Las líneas rojas delimitan la zona donde las células crecen sobre un electrodo transparente, denominada zona electroporada (zona izquierda) de la zona no electroporada (zona derecha). La comunicación celular a través de canales de conexina disminuye significativamente cuando incubamos las células en presencia de 250 μ M de GAP27 durante 1h. La línea celular A549 fue utilizada como control negativo. (D) Cuantificación de la transferencia de glucosa. La gráfica representa el número de células de la zona no electroporada que han captado glucosa fluorescente, frente al número de células localizadas en el margen de electroporación (línea roja). Los datos se presentan como Media \pm S.E.M., n = 6, test de Mann-Whitney, ** p < 0.01; no tratado frente a GAP27, y no tratado frente a A549.

1.3.2. Estudio de la transferencia directa de aminoácidos, péptidos y proteínas: Sistema de co-cultivo en membrana porosa y espectrometría de masas

El sistema de co-cultivo en membrana porosa fue utilizado para estudiar la capacidad de los condrocitos articulares humanos para intercambiar aminoácidos, péptidos y proteínas. En este sistema dos poblaciones de condrocitos provenientes del mismo donante se crecieron bajo dos

condiciones utilizando un marcaje con isótopos estables (SILAC) en membranas porosas o *transwell* de 3 µm de poro. Una población de células fueron crecidas en medio marcado con L-lisina [$^{13}\text{C}_6$] y L-arginina [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$], estas células recibieron el nombre de células donantes al estar marcadas con aminoácidos no presentes de manera natural en las células. La otra población estaba formada por células crecidas en un medio que contiene L-lisina y L-arginina naturales; estas células recibieron el nombre de células receptoras. Además, una población control de células (no marcadas) se colocaron en la base del pocillo donde se llevó a cabo el experimento.

Las dos poblaciones de condrocitos fueron crecidas en su medio correspondiente hasta alcanzar una confluencia del 80% aproximadamente. Debido al montaje del experimento, cada población de células fue colocada de manera independiente en la membrana porosa. Las células receptoras (no marcadas), se colocaron en la base de la membrana durante 4 horas para asegurarnos de su adherencia. Una vez transcurridas las 4 horas, colocamos las células donantes (marcadas) en la parte superior de la membrana. El control de células no marcadas se colocó en la base del pocillo. Durante todo el experimento, las células fueron resuspendidas en medio con lisina y arginina no marcadas para evitar la aparición de falsos positivos en el análisis mediante técnicas de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) (ver esquema de la **Figura 30A**).

Con el objetivo de estudiar únicamente la incorporación directa de aminoácidos marcados entre células en contactos, el experimento en *transwell* fue llevado a cabo utilizando tiempos cortos de incubación para evitar la transferencia de los aminoácidos marcados al medio de cultivo y posterior incorporación a las células receptoras (transferencia indirecta). Las células donantes y receptores (y controles) estuvieron en contacto durante un total de 4 horas.

Para comprobar la adherencia de las células a ambos lados de la membrana, realizamos una IHQ sobre las membranas 4 horas después de que las células fuesen adheridas en ambos lados de la membrana (**Figura 30B**). Utilizando el anticuerpo monoclonal anti-Cx43, detectamos positividad a ambos lados de la membrana así como también, detectamos positividad para las proyecciones citoplasmáticas que atraviesan los poros de la membrana con un tamaño de 3 µm de diámetro.

La transferencia de aminoácidos, péptidos y proteínas entre condrocitos articulares en cultivo fue analizada mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). Para ello, las células (donantes, receptoras y controles) utilizadas en el experimento se lavaron con PBS, se rasparon con gomas estériles, se recogieron en tubos y se guardaron a

-80°C como se explica detalladamente en el apartado de *Materiales y Métodos*. Con el objetivo de romper la membrana plasmática y liberar el contenido celular, las células fueron lisadas usando una solución que contenía 10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 1% NP40, 1mM PMSF y se dejaron durante 20 min a 4°C. A continuación, se les añadió la solución de dilución (10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA). El lisado celular obtenido fue transferido a filtros especiales de 3 kDa. Una vez centrifugadas y como resultado de la separación obtuvimos dos fracciones: por un lado, la fracción < 3 kDa y por otro lado la fracción > 3 kDa, en ambos casos fueron almacenadas a -80°C.

1.3.2.a Transferencia de aminoácidos entre condrocitos articulares humanos en cultivo

En el estudio de la transferencia de aminoácidos, utilizamos la fracción correspondiente a < 3 kDa. La fracción resultante de la lisis proteica se secó en una centrifuga de vacío (*Speedvac*-Savant SPD 121P, Thermo) y se envió al SAI donde se llevó a cabo la identificación de aminoácidos libres. La identificación y cuantificación de aminoácido libre utilizando ESI*/LC/MS-Orbitrap, reveló que las células receptoras contienen una cantidad de ~ 0,03 nmol/mL de L-lisina [$^{13}\text{C}_6$] y ~ 0,0175 nmol/mL de L-arginina [$^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}_4$], confirmando que los condrocitos en cultivo son capaces de transferir aminoácidos esenciales a través de los canales de Cxs (**Figura 30C**). En el caso de las células control (sin contacto directo con las células receptoras) se detectó una pequeña cantidad de lisina marcada, sin embargo la cantidad detectada fue significativamente diferente de la cantidad de aminoácido marcado detectado en las células receptoras (en contacto directo con las células donantes). Por otra parte, no se detectó arginina marcada en las células control. La cantidad de arginina marcada en el medio de cultivo fue inferior a la cantidad de lisina porque en el caso de la arginina cantidades mayores dan lugar a la transformación de arginina en prolina.

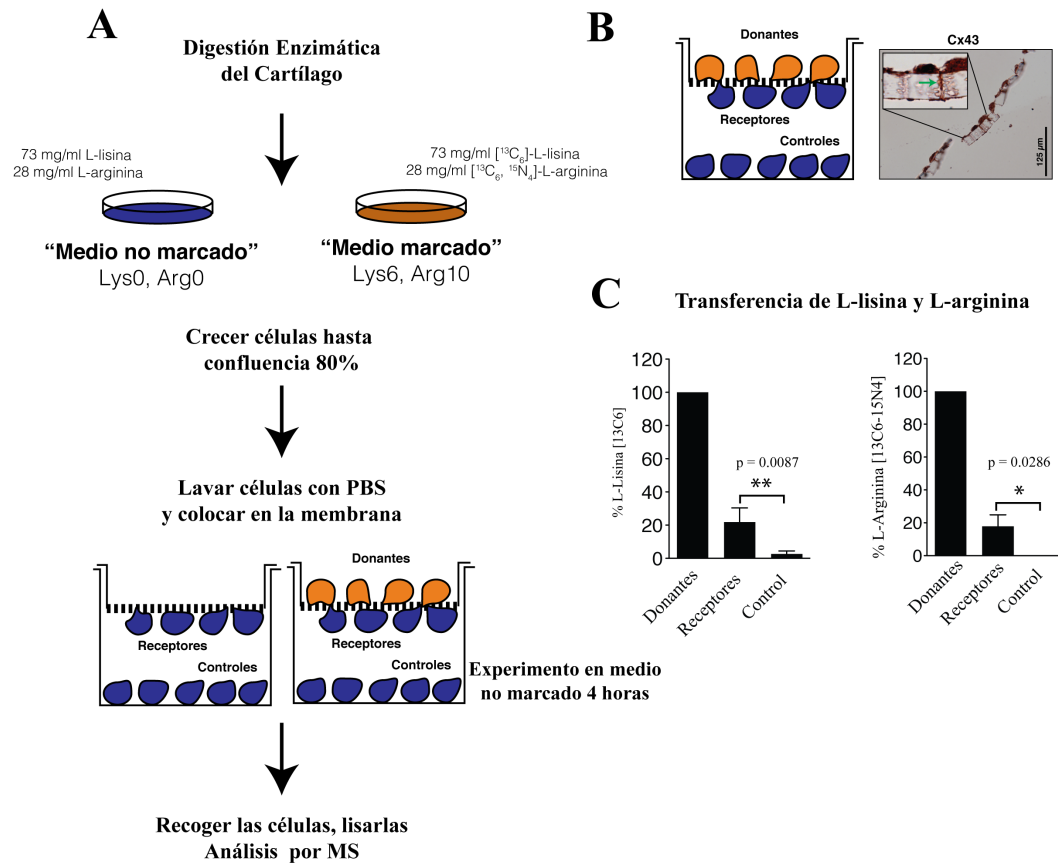


Figura 30. Estudio de la transferencia directa de aminoácidos entre células en contacto. (A) Esquema resumen del sistema de co-cultivo en *transwell* y marcaje no radioactivo de aminoácidos esenciales utilizando el método de marcaje isotópico denominado SILAC. (B) IHQ usando el anticuerpo anti-Cx43. Se muestra la membrana *transwell* usada para el co-cultivo que contiene condrocitos articulares humanos adheridos a ambos lados de la membrana. La flecha verde señala la positividad para Cx43 detectada en los poros de la membrana. (C) Análisis de la transferencia de aminoácidos esenciales entre condrocitos en cultivo usando el co-cultivo en *transwell*. Las células marcadas se crecieron en un medio que contenía 73 mg/mL de [$^{13}\text{C}_6$]-L-Lisina y 28 mg/mL de [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$]-L-Arginina y se colocaron en la parte superior de la membrana. Las células receptoras crecidas en un medio con aminoácidos no marcados se colocaron en la parte de debajo de la membrana (receptoras) y como control en la base del pocillo (control). Los datos se presentan como media \pm S.E.M.; n = 4 para L-Arginina y n = 6 para L-Lisina. Mann-Whitney test, ** p = 0.0087, *p = 0.0286; Células receptoras frente a controles.

1.3.2.b Transferencia directa de proteínas entre condrocitos en contacto

El estudio de la transferencia de péptidos y proteínas lo llevamos a cabo utilizando la fracción del lisado celular correspondiente a > 3 kDa obtenida tras la separación en filtros especiales. Como ya se ha comentado en el apartado de *Materiales y Métodos*, el lisado celular con tamaño > 3 kDa se secó en una centrifuga de vacío (*Speedvac*, Savant SPD 121P, Thermo), se resuspendió en tampón de carga y se separó en distintas bandas utilizando SDS-PAGE en geles de acrilamida/bisacrilamida al 10%. A continuación, el gel se tiñó con Coomassie Brilliant Blue G250 y las bandas resultantes se cortaron y procesaron. Cada banda fue

procesada de manera independiente, digerida con tripsina durante 16 h a 37°C y finalmente se realizó la extracción de péptidos con la posterior limpieza y desalinización de la muestra. Las fracciones peptídicas obtenidas tras la digestión con tripsina, se separaron usando cromatografía líquida de fase reversa (Tempo Nano-LC Applied Biosystem) y fueron colocadas en formas de pequeñas gotas en una placa de MALDI para finalmente ser analizadas en un espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF/TOF. Los datos obtenidos en el MALDI-TOF/TOF fueron utilizados para la identificación y relativa cuantificación de las proteínas utilizando el programa Protein Pilot 3.0 (Applied Biosystems).

Los resultados obtenidos permitieron la identificación de proteínas marcadas en la muestra denominada como receptores sugiriendo que existe transferencia directa de proteínas entre condrocitos en contacto (**Tabla 8**). Además, utilizando como donantes, células aisladas del hueso subcondral y de la membrana sinovial, hemos demostrado que los diferentes tipos celulares que forman parte de la articulación sinovial son capaces de intercambiar aminoácidos y proteínas. Los datos obtenidos mediante espectrometría de masas y mostrados en la **Tabla 8**, demostraron que existe comunicación directa entre condrocitos y células de la membrana sinovial, así como también entre condrocitos y células de hueso subcondral.

RESULTADOS

Número acceso	Proteína	% Cov	Localización celular	Nombre del gen	Masa(Da)	Péptidos marcados identificados	Tipo de transferencia		
							Condro - Condro	Condro - Sinovio	Condro - Hueso
P63261	Actina citoplasmática 2	63.7	Citoplasma, citoesqueleto	<i>ACTG1</i>	41,792	AVFPSIVGPR VAPEEHPVLLTEPLNPK* GYSFTTTAER SGGTMYPGIAIR	X X X		X
P50454	Serpina H1	20.3	RE, lumen	<i>SERPINH1</i>	46,441	DVERTDGALLVNAMFFKPHWDEK	X		
P27797	Calreticulina	26.4	Citoplasma, citosol	<i>CALR</i>	48,142	GLQTSQDARFYALSASFEPFSNK	X		
P146252	Endoplasmína	29.0	RE, lumen	<i>HSP90B1</i>	92,469	NLGTIAKSGTSEFLNK	X		
P25705	ATP sintetasa subunidad alfa mitocondrial	20,3	Membrana interna de la mitocondrial	<i>ATP5A1</i>	59,751	VQKEEMWEFSSGLK		X	
P16070	Antígeno CD44	13,5	Membrana	<i>CD44</i>	81,538	ALSIGFETCR*		X	
Q14697	Neutral alfa-glucosidasa AB	9	RE, Aparato de Golgi	<i>GANAB</i>	106,874	RQEFLLR*		X	
P04092	Proteína <i>Heat shock beta-1</i>	30,7	Citoplasma, núcleo	<i>HSPB1</i>	22,783	SSGVSEIRHTAIR		X	
P07900	Proteína <i>Heat shock HSP 90-alfa</i>	13,5	Citoplasma, melanosoma	<i>HSP90AA1</i>	84,66	AAVIEEMPPEGDDTSR*		X	
P08670	Vimentina	91,2	Citoplasma	<i>VIM</i>	53,652	ALDIEIATTR		X	
P02545-3	Isoforma ADelta10 de la Prelamina-A/C	41,3	Núcleo, envoltura nuclear	<i>LMNA</i>	70,661	GEGSHCSSSGDPREYSLR*		X	
P04406	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	31,3	Citosol, citoplasma, núcleo	<i>GADPH</i>	36,053	VGWHGFGRDGR		X	
P21333	Filamina-A	26,9	Citoplasma	<i>FLNA</i>	280,739	GPGIEGQGVFRENT			X
P27824	Calnexina	13,2	Membrana del RE	<i>CANX</i>	67,568	KAADGAAEPGVVGQMIEAAEE*			X

Tabla 8. Proteínas identificadas mediante LC/MS-MS. Se muestra la cobertura (% Cov) obtenida en el Protein Pilot; la secuencia de péptidos marcados identificados para cada proteína, y el peso molecular (Da). Sólo proteínas con confianza > 95% y score > 1 fueron consideradas en este estudio. (n = 2)

1.4. Expresión de la conexina 43 en cartílago articular de pacientes con artrosis

El cartílago articular de pacientes con OA sufre una serie de cambios que afectan a la propia estructura y función del tejido. Uno de los cambios más tempranos y evidente a nivel microscópico es la pérdida progresiva de proteoglicanos y otros componentes de la MEC. En la **figura 31A** se muestra la estructura del cartílago con una tinción de Safranina-O Fast Green donde comparamos una muestra de tejido de un donante sano con muestras de tejidos de pacientes con OA en diferentes grados de la enfermedad. La tinción con Safranina-O Fast Green tiñe los proteoglicanos; la intensidad de coloración naranja-butano es directamente proporcional a la cantidad de proteoglicanos presentes en la muestra. En los pacientes con OA existe pérdida de proteoglicanos que se observa por una disminución en la coloración naranja-butano y de forma más evidente por la aparición del color azul turquesa (verde luz). En la **figura 31A** se representan los patrones observados en diferentes grados de OA (I, III, IV). La clasificación en los diferentes grado de OA se llevó a cabo utilizando el método *Mankin score* modificado según lo descrito en *Materiales y Métodos*. A mayor grado de la enfermedad, existe mayor pérdida de proteoglicanos, así como también, se detecta un aumento de tamaño en las lagunas donde se encuentran los condrocitos. El daño es más pronunciado en las capas superficiales, en contacto con el líquido sinovial, y según el grado de la enfermedad avanza a medida que aumentamos en la profundidad en el cartílago.

Para el análisis de los niveles y de la localización de la Cx43 en tejido se utilizaron técnicas de IHQ y explantes de cartílago de pacientes con OA en diferentes grados de la enfermedad. Los resultados obtenidos se presentan en la **figura 31B**, donde pudo observarse altos niveles de positividad para la Cx43 en todas las muestras de pacientes con OA, independientemente del grado de la enfermedad, en comparación con las muestras sanas. De hecho, ya se detectaron niveles significativamente más elevados de Cx43 en cartílago de pacientes con OA en grado I. Los resultados de la cuantificación indicaron que los pacientes con OA presentan un incremento de 4 veces en los niveles de Cx43 en la zona intermedia y superficial respecto a los donantes sanos (**Figura 31C**). La cuantificación del número de puntos positivos para Cx43 por célula, determinó que los condrocitos de pacientes OA presentan mayor número de marcaje positivo en forma de puntos para la Cx43, en el citoplasma, en los márgenes de las células y bordes de lagunas, en comparación con condrocitos de cartílago de donantes sanos (**Figura 31D**).

En cuanto a la localización de la proteína, pudo observarse Cx43 en el citoplasma y bordes de la célula tanto en la capa superficial como intermedia de donantes sanos y pacientes con OA;

sin embargo, en las zonas no dañadas de la capa intermedia y profunda, sólo detectamos puntos positivos en el borde de la laguna en un ~20% de las células. En el resto de las células, en aquellas que se detectó positividad para la Cx43 únicamente pudo observarse en el citoplasma, alrededor del núcleo y no en la membrana celular.

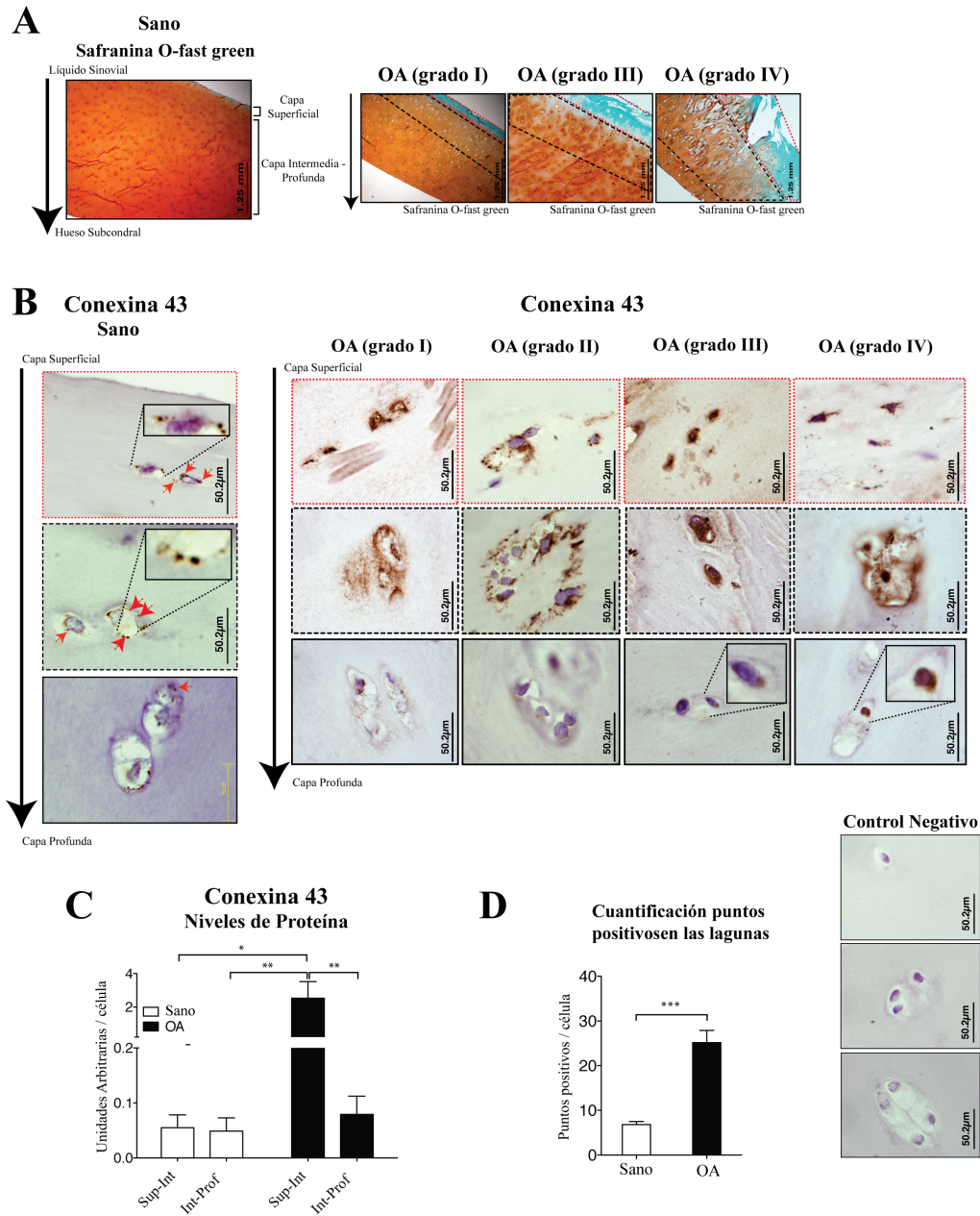


Figura 31. Niveles y localización de la Cx43 en cartilago de donantes con OA (A) La tinción Safranina O - Fast Green de un explante de cartilago sano (izquierda) muestra color homogéneo naranja-butano para la tinción. La coloración homogénea explica el contenido de proteoglicanos de la muestra, característico de cartilago sano. El cartilago de los pacientes con OA (derecha) presenta pérdida de proteoglicanos que se hace más severa a medida que avanzamos en el grado de la enfermedad. Cada paciente fue incluido en un grado de la enfermedad utilizando el método de *Mankin score* modificado. (B) IHQ utilizando explantes de cartilago y anti-Cx43 donde estudiamos los niveles y la localización de la Cx43 en cartilago de donante sanos (izquierda) y pacientes con diferentes grados de la enfermedad (derecha). Se indica también la localización de la Cx43 (flechas rojas) que aparece como puntos positivos en el borde de la laguna. Se muestra la magnificación de alguna de las señales positivas para Cx43. (C) La cuantificación de los resultados de la IHQ muestra que los pacientes con OA presentan mayores niveles de Cx43 en la zona superficial y en la superficial – intermedia. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Kruskal Wallis análisis con un test de Dunn's de comparación múltiple (donantes sanos $n = 4$; pacientes OA cadera $n = 6$; pacientes OA rodilla $n = 6$). (D) Representación gráfica del número de puntos positivos para Cx43 por célula (donantes sanos $n = 17$; pacientes con OA $n = 17$). *** $p < 0.0001$; usando la t-Student; muestras sanas frente a OA (Media \pm S.E.M.). Las cuantificaciones fueron realizadas utilizando el programa AnalySIS^D versión 5.0 (Olympus Biosystems, Germany).

1.4.1. Estudio de la relación de la conexina 43 con proliferación celular en condrocitos

El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) es una proteína que se localiza en el núcleo de células que están en proceso de división celular lo que permite detectar proliferación celular. La técnica IHQ utilizando un anticuerpo anti-PCNA reveló que el cartílago de donantes sanos presenta bajos niveles de PCNA y con localización pericelular o citoplasmática; sin embargo, los pacientes con OA muestran valores elevados de PCNA nuclear en la capa superficial e intermedia donde la MEC del cartílago está dañada (**Figura 32A**). Cabe destacar que las muestras de donantes con OA que presentaban zonas con muy altos niveles de proliferación en la capa superficial del cartílago, caracterizada como regiones con alto número de células, presentaron altos niveles de PCNA y de Cx43 (**Figura 32C**). Las zonas no dañadas del cartílago de pacientes con OA mostraron un patrón de positividad para PCNA similar al detectado en muestras de cartílago sano. La cuantificación de los niveles de PCNA basada en la positividad detectada mediante IHQ se muestra en la **figura 32B**.

Tras los resultados obtenidos mediante IHQ que mostraron niveles elevados de Cx43 y PCNA en las mismas regiones del tejido, decidimos estudiar el efecto de la inhibición de los canales de Cx43 en proliferación celular. Para ello, decidimos utilizar 1-Octanol como agente bloqueante de la actividad de los canales de conexinas: los canales de Cxs fueron bloqueados utilizando 1 mM de 1-Octanol. Los resultados correspondientes al tratamiento de condrocitos y explantes de tejido con 1 mM de 1-octanol no se muestran debido a que forman parte de una patente PCT pendiente de registrar.

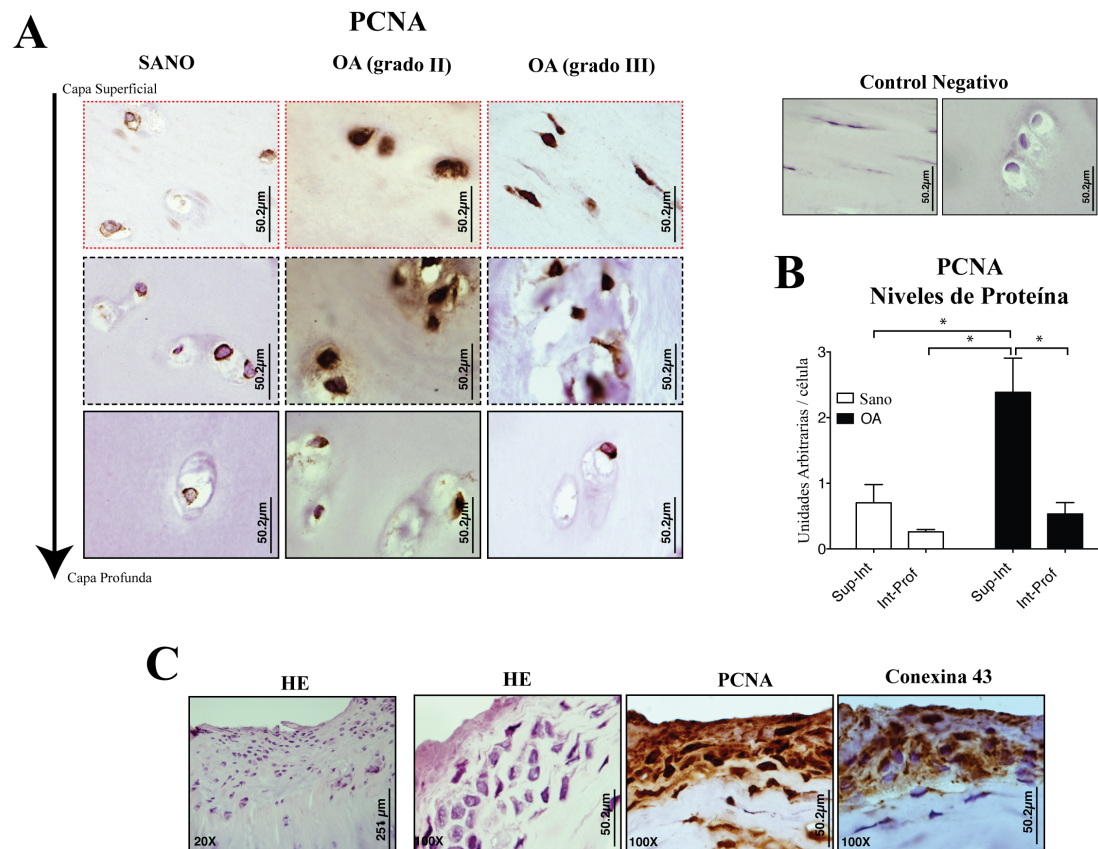


Figura 32. Estudio de los niveles y localización de PCNA y Cx43 en cartilago adulto. (A) IHQ usando el anticuerpo anti-PCNA. El cartilago de pacientes con OA presenta niveles elevados de PCNA en las zonas dañadas del cartilago (zona superficial e intermedia) y está localizado en el núcleo celular. Los explantes de cartilago de pacientes con OA mostrados en las imágenes corresponden con pacientes con grado II y grado III de la enfermedad. El control negativo se muestra a la derecha de la imagen (B) Cuantificación de los niveles de positividad detectados para PCNA. Se han analizado un total de 4 cartilagos de donantes sanos, 6 cartilagos de OA de cadera y 4 cartilagos de OA de rodilla. Los datos se muestran como Media \pm S.E.M., * $p < 0.05$ test de Kruskal-Wallis y test de comparación múltiple de Dunn. (C) Las imágenes se corresponden con cortes seriados de un mismo explante de cartilago de un paciente con OA que presenta agrupaciones de células de la zona superficial del cartilago: hematoxilina-eosina e IHQ utilizando anti-PCNA y anti-Cx43.

1.4.2. Estudio de los niveles de diferentes conexinas en tejido

En la **figura 23B** se muestra el análisis de la expresión génica de diferentes conexinas en condrocitos primarios aislados de cartilago humano y crecidos durante 2 - 6 semanas en cultivo monocapa. Estos resultados, junto con los resultados de electrofisiología mostrados en la **figura 26A**, demostraron que los condrocitos en cultivo expresan altos niveles de Cx43 y forman canales funcionales compuestos por Cx43. Sin embargo, los condrocitos en cartilago se encuentran rodeados de una densa MEC, lo que genera un microambiente totalmente diferente al formado durante el cultivo celular. Debido a que el entorno podrían afectar a la expresión de diferentes conexinas y al tipo de comunicación celular, decidimos estudiar los

niveles de otras conexinas tales como la Cx32, Cx45 y Cx36 en explantes de cartílago mediante técnicas de IHQ.

Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 33**. Estos resultados demuestran que a diferencia de lo que ocurría en condrocitos en cultivo, los condrocitos en cartílago de donantes sanos presentan niveles detectables de Cx45 en todas la capas del cartílago, especialmente en la capa superficial, y se localiza como puntos positivos en el citoplasma y en el margen de las células (**Figura 33A**). Si comparamos estos resultados con los obtenidos para explantes de cartílago de pacientes con OA, podemos observar que, al igual que ocurría para la Cx43 (**Figura 31B**), la Cx45 presenta mayor expresión en condrocitos de cartílago de pacientes con OA. Este incremento en la expresión es significativo en todas las zonas del cartílago, y ocurre desde grado I de la enfermedad (**Figura 33A**). En la **figura 33B** se muestran los resultados de la cuantificación para la Cx45 en cartílago de donantes sanos y pacientes con OA; como ya se ha comentado, se detectaron mayores niveles de la proteína en las zona superficial-intermedia del cartílago de pacientes con OA en relación al cartílago de donantes sanos.

En el caso de la Cx32 y Cx46, ambas proteínas se localizan en el citoplasma y principalmente en el margen de las células (**Figura 33C**). En explantes de cartílago de pacientes con OA, la Cx32 fue detectada principalmente en la zona intermedia del cartílago; mientras que la Cx46 se localiza preferentemente en la zona superficial-intermedia. Aunque hemos detectado ambas conexinas (Cx32 y Cx46) en pacientes con OA, en muchos casos la técnica IHQ resultó negativa, y en otros casos se detectaban niveles elevados. Debido a la disparidad entre muestras no fuimos capaces de encontrar diferencias y caracterizar los niveles y localización de la proteína con el objetivo de obtener un patrón diferencial entre sanos y pacientes con OA.

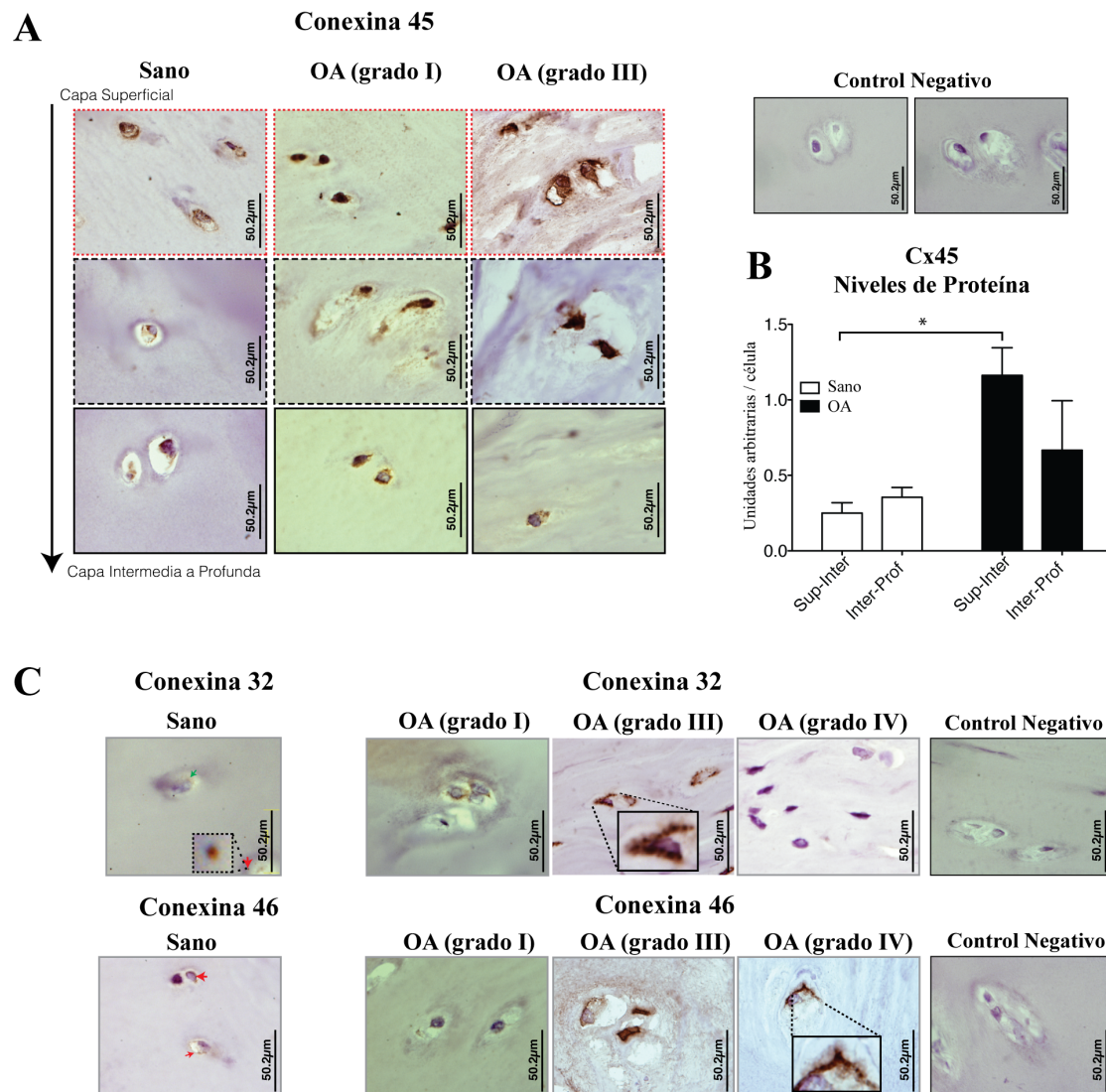


Figura 33. Estudio de los niveles de Cx45, Cx32 y Cx46 en explantes de cartilago humano. (A) IHQ usando el anticuerpo anti-Cx45 con contratinción con hematoxilina de Gill III. Se detectaron puntos positivos en citoplasma y en el margen de las células/lagunas tanto en cartilago de donantes sanos como en pacientes con OA. (B) Cuantificación de los niveles de positividad por célula, detectados para Cx45 en cartilago de donantes sanos y pacientes con OA. Los datos se muestran como Media \pm S.E:M., n = 3 donantes sanos; n = 10 pacientes con OA; * p<0.05; test de Kruskal-Wallis utilizando el test de Dunn de comparación múltiple. (C) IHQ usando los anticuerpos anti-Cx32 y anti-Cx46 (donantes sanos n = 3). La Cx32 y Cx46 fueron detectadas en cartilago procedente de pacientes con OA (cartilago proveniente de rodilla n = 4; cadera n = 6)

1.5. Modificaciones postraduccionales de la conexina 43: Glicosilación

En la sección anterior demostramos que los pacientes con OA presentan un incremento en los niveles de Cx43 al ser comparados con los donantes sanos. Este incremento en los niveles de Cx43 puede no ser debido a un aumento en la expresión génica, sino a una diferencia por ejemplo en la estabilidad de la proteína. Por este motivo, uno de los objetivos de este proyecto

era estudiar algunas de las posibles modificaciones postraduccionales (MPTs) que sufre la Cx43 en donantes sanos y pacientes con OA. Debido a que en el cartílago articular prácticamente todas las proteínas de la MEC están altamente glicosiladas, decidimos estudiar si la Cx43 sufría glicosilación.

La identificación de los sitios potenciales de glicosilación para la Cx43 se llevó a cabo utilizando el programa denominado GlycoEP (<http://www.imtech.res.in/raghava/glycoep/>) que predice los sitios de glicosilación (N-glicosídico, O-glicosídico) en eucariotas.

Los resultados obtenidos en base a la predicción de GlycoEP sugieren que la Cx43 presenta tres sitios potenciales de glicosilación localizados en el dominio C-terminal (**Figura 34**). Se intentó confirmar la presencia de estos sitios de glicosilación mediante espectrometría de masas utilizando *Orbitrap Elite™ Hybrid Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer*. Para ello se realizó una inmunoprecipitación usando el anticuerpo monoclonal anti-Cx43 con el objetivo de enriquecer las muestras en Cx43. A continuación, se llevó a cabo una precipitación con metanol:cloroformo y posterior digestión en solución con 8 M de urea. Para detectar los sitios de glicosilación de la proteína, realizamos un tratamiento con *PNGase F*. Para el análisis mediante espectrometría de masas las muestras fueron digeridas con tripsina, secadas en una centrífuga de vacío y resuspendidas en 70% ácido fórmico, 0.1% TFA. Los experimentos de espectrometría de masas se llevaron a cabo en colaboración con el Servicio de Proteómica de la Universidad de Yale (W.M. Keck Biotechnology Resource Laboratory) bajo la supervisión del Dr. Tukiet Lam y con el grupo dirigido por el Dr. Juan Fernández de la Mora (Mason Laboratory) en la Universidad de Yale durante una estancia de 3 meses. No fuimos capaces de detectar la Cx43 mediante espectrometría de masas debido a que se trata de una proteína de membrana con unas características químicas que hacen difícil su detección por técnicas de proteómica. Este estudio se continuará en colaboración con otro grupo de investigación que realicen este tipo de ensayos de proteómica utilizando proteínas transmembranas similares a la Cx43.

GlycoEP: Predicción de N- y/o O- sitios de glicosilación

> seq Length = 382 Potential N-Linked Glycosylated Sites:
 MGDWSALGKLLDKVQAYSTAGGKVLVSVLFIIRILLGTAVESAWGDEQSAFRCNTQPGCENVCYDKSFPISHVRFVWLQIIFVSVPTLLYLAVHVFYVM
 RKEEKLNKKEEELKVAQTDGVNDMHLKQIEIKFKYGIEEHGKVKMRGGLRTYIISILFKSIFEVAFLLIQWYIYGFSLSAVYTCKRDCPHQVDCF
 LSRPTEKTIFIIFMLVSVLSLALNIIELFYVFFKGVDKRVKGSQPYHATSGALSPAKDCGSQKYAYFNGCSSPTAPLSPMSPPGYKLVTDGRNNSSC
 RNNKQASEQNWANYSAEQNRMQAGSTISNSHAQPFDFPDDNQNSKKLAAGHELOPLAIVDQRPSSRASSRASSRPRPDLEI

----- Position Residue Score Prediction -----

55 NTQ -0.6322645 Non-glycosylated	295 NSS 1.0314464 Potential Glycosylated
63 NVC -0.88119288 Non-glycosylated	300 NYN -1.2060451 Non-glycosylated
107 NKK -1.0716355 Non-glycosylated	302 NKQ -0.79218235 Non-glycosylated
122 NVD -1.1784243 Non-glycosylated	309 NWA -1.1200099 Non-glycosylated
224 NII -0.81939914 Non-glycosylated	312 NYS 0.95954917 Potential Glycosylated
269 NGC -0.51364783 Non-glycosylated	318 NRM -0.57629813 Non-glycosylated
294 NNS 0.75653305 Potential Glycosylated	329 NSH -1.2982401 Non-glycosylated
	341 NQN -1.0937222 Non-glycosylated
	343 NSK -0.98680047 Non-glycosylated

Figura 34. Predicción de los sitios de glicosilación para la Cx43 utilizando el programa GlycoEP. En la figura se muestra la secuencia aminoacídica de la Cx43 (arriba). La secuencia aminoacídica fue introducida en formato FASTA. Los resultados que se muestran son los generados directamente por el programa utilizado. Cada sitios potencial de glicosilación está representado en color rojo. Acompañando a cada sitios de glicosilación aparece una puntuación proporcionada por el programa también. Los potenciales sitios de glicosilación potencialmente válidos son los que el programa marca en color verde y se corresponde con aquellos que han obtenido buena puntuación. Además, aunque no se muestra en la figura, también se predijeron potenciales sitios de O-glicosilación.

2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA LECTINA MASL EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL CARTÍLAGO ADULTO

La sialización de una proteína es un tipo de modificación que ocurre en glicoproteínas en posición terminal y puede ocurrir en posición α -2,6, α -2,8 o α -2,3. Las posiciones más estudiadas son la α -2,6 y la α -2,3 siendo ambas posiciones excluyentes. En el caso del cartílago articular, varios autores han sugerido que el fenotipo celular podría depender del tipo de sialización que sufren las proteínas y receptores de la membrana de los condrocitos. Un cambio de posición de α -2,6 a α -2,3 se ha asociado con cambios en el fenotipo celular y con el desarrollo de artrosis^{124,132}.

2.1 Presencia de glicoproteínas sializadas en posición α -2,3 en cartílago articular

La presencia de glicoproteínas sializadas en posición α -2,3 en cartílago articular se estudió utilizando una lectina denominada MASL. MASL se une específicamente a glicoproteínas que presentan este tipo de modificación terminal¹⁴¹. MASL se obtiene de una semilla de un árbol (*Maackia amurensis*) y en este caso, fue purificada por la compañía Sentrimed (NJ,USA). Esta lectina fue donada por el Dr. Gary S. Goldberg (*Rowan University*, NJ, USA).

Se ha utilizado la podoplanina (PDPN) como un control de proteína altamente glicosilada con residuos de ácido siálico en la posición α -2,3 debido a que ha sido definida como una proteína implicada en el desarrollo de patologías articulares como la AR¹⁵⁹⁻¹⁶². Secciones de cartílago de donantes sanos y pacientes con OA fueron analizadas bajo técnicas de IHQ utilizando el anticuerpo anti-PDPN (ver tabla anticuerpos en *Materiales y Métodos*). Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 35** donde observamos positividad en cartílago de donantes sanos. Los pacientes con OA presentaron un incremento en los niveles de PDPN, presentando mayores niveles de positividad desde la zona superficial hacia la profunda con respecto a los donantes sanos (**Figura 35**). Las imágenes obtenidas sugieren que la PDPN se localiza principalmente en el margen celular (membrana citoplasmática) y en algunos casos, de muestras provenientes de donantes con OA, pudimos observar positividad en el núcleo. El ensayo de inmunofluorescencia utilizando condrocitos primarios en cultivo demostró la co-localización de la lectina MASL y PDPN (**Figura 36A**).

Cartílago articular Podoplanina

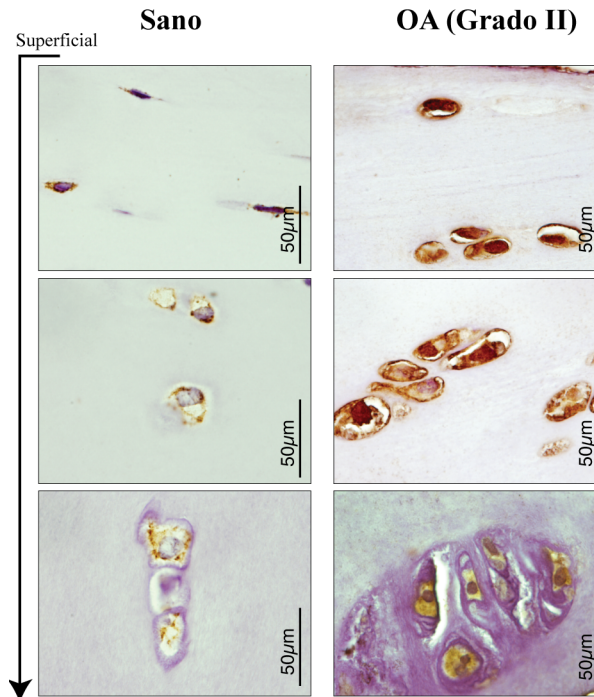


Figura 35. Estudio de la presencia de PDPN en cartílago de donantes sanos y pacientes con OA. En la imagen se muestra el patrón de distribución de la PDPN en cartílago de donantes sanos (izquierda) y pacientes con OA grado II (derecha) desde la capa superficial hacia la profunda (flecha). Los pacientes con OA presentaron mayores niveles de PDPN en todas las zonas del cartílago al compararlos con el donante sano; (n = 4 sanos; n = 9 OA)

Con el objetivo de investigar la unión de MASL a cartílago articular, secciones de 4 µm de cartílago congelado utilizando Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound e isopentano en nitrógeno líquido, procedentes de cartílago de donantes sanos y pacientes con OA fueron incubadas con MASL conjugado con *HiLyte Fluor TR* (rojo), como se explica en *Materiales y Métodos*, durante 20 minutos a temperatura ambiente. El análisis de microscopía confirmó mayor unión de MASL a cartílago de los pacientes con OA respecto a sanos (**Figura 36B**).

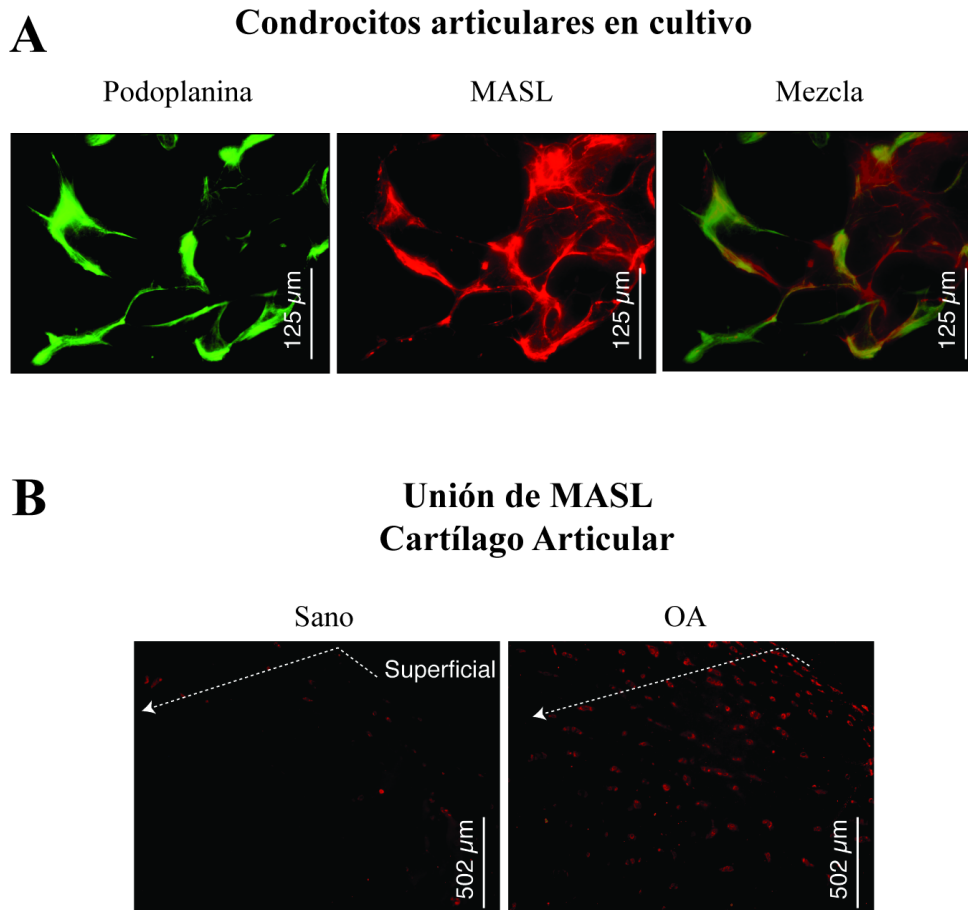


Figura 36. Unión de la lectina MASL a glicoproteínas presentes en células en cultivo y explantes de tejido. (A) Condrocitos primarios en cultivo provenientes de donantes sanos y pacientes con OA se pusieron en contacto con MASL conjugado con *HiLyte Fluor TR* (rojo) durante 20 minutos a temperatura ambiente. La PDPN fue detectada mediante inmunofluorescencia (verde). La colocación de la lectina (rojo) y la PDPN (verde) se muestra en la derecha. (B) La presencia de glicoproteínas con residuos de ácido siálico en posición α -2,3 fue analizada en explantes de cartílago provenientes de donantes sanos y pacientes con OA. Una mayor unión de MASL a cartílago de pacientes con OA, indica que presentan mayor cantidad de glicoproteínas sializadas en enlace α -2,3 ($n = 3$ sanos; $n = 3$ OA).

2.2. Efecto de MASL en viabilidad, adhesión y crecimiento celular de condrocitos primarios

La posible toxicidad de concentraciones nanomolares de MASL fue evaluada mediante diferentes ensayos. En primer lugar, realizamos un ensayo MTT de viabilidad celular donde los condrocitos primarios en cultivo fueron sometidos a tratamiento con 400 y 720 nM de MASL durante 1 y 17 horas. Además, utilizamos bajas concentraciones de oligomicina (5 μ g/mL), un bloqueante de la ATP sintetasa mitocondrial que posteriormente utilizamos para generar estrés o daño celular *in vitro*. Como se puede observar en la **figura 37A**, las

concentraciones de MASL u oligomicina utilizadas para este ensayo no afectaron a la viabilidad celular. Del mismo modo, se realizaron ensayos para estudiar el efecto de MASL en adhesión y crecimiento celular. Las células se adhirieron sobre placas cubiertas con fibronectina. Como control negativo se utilizaron placas con BSA que no permite que las células se adhieran a la placa. Diferentes tipos celulares (condrocitos primarios, células primarias provenientes de la membrana sinovial y la línea celular T/C-28a2) han sido analizados utilizando las mismas concentraciones de MASL. Además, se llevó a cabo un ensayo de crecimiento (*Wound Healing Assay*, Cell Biolabs Inc) donde evaluamos si diferentes concentraciones de MASL afectaban a proliferación celular. Como puede verse en los resultados mostrados en la **figura 37**, las concentraciones seleccionadas de MASL no afectaron ni a adhesión, ni a crecimiento de condrocitos primarios, sinoviocitos ni a la línea celular de condrocitos T/C-28a2 (**Figura 37B y 37C**).

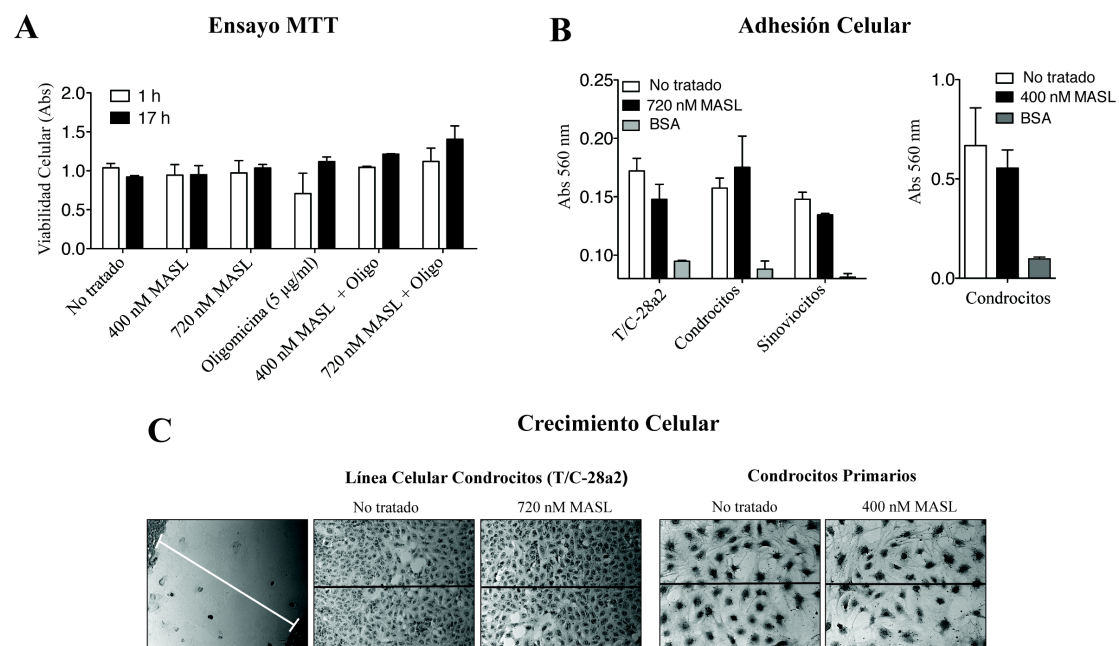


Figura 37. Estudio del efecto de diferentes concentraciones de MASL en viabilidad, adhesión y crecimiento celular (A) Condrocitos primarios se crecieron en medio DMEM en presencia de 0 nM, 400 nM y 720 nM de MASL, y con/sin 5 µg/mL de oligomicina durante 1 o 17 horas. El ensayo MTT fue utilizado para evaluar la citotoxicidad de la lectina (Media \pm S.E.M., $n = 2$). (B) La adhesión celular fue evaluada con placas recubiertas de fibronectina en condrocitos primarios, sinoviocitos y T/C-28a2 siguiendo las indicaciones del ensayo comercial *Cell Adhesion Assay* (Cell Biolabs, INC). Las células fueron tratadas durante 1 hora con las concentraciones de MASL indicadas en la figura. Los resultados se presentan como Media \pm S.E.M., $n = 2$. Placas recubiertas con BSA han sido usadas como control negativo. (C) Los condrocitos (línea celular T/C-28a2 y condrocitos primarios) se crecieron hasta alcanzar confluencia en pocillos que contenían un inserto que generaba un hueco de 0,9 mm (*Wound Healing Assay*, Cell Biolabs INC). Una vez retiramos el inserto, las células se tratan con 400 nM o 720 nM de MASL durante 24 horas (T/C-28a2) o 10 días (condrocitos primarios); ($n = 4$). Las imágenes fueron obtenidas utilizando el microscopio óptico invertido Nikon Eclipse Ti y le programa NIS Elements.

2.3. Efecto de MASL sobre la producción de especies reactivas de oxígeno, mediadores proinflamatorios y enzimas que degradan la matriz

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y mediadores proinflamatorios aumentan, de forma significativa, en periodos agudos de diferentes patologías articulares incluyendo la OA. Dado que nuestro objetivo es estudiar el efecto de MASL bajo condiciones patológicas, decidimos utilizar 5 µg/mL de oligomicina con el objetivo de simular dichas condiciones en condrocitos en cultivo (modelo de daño *in vitro*).

Se seleccionó la oligomicina como tratamiento para generar estrés celular porque el tratamiento de explantes de cartílago con 5 µg/mL de oligomicina durante 7 días generó daño tisular en los explantes en cultivo, detectado como un incremento en los niveles de expresión de enzimas que degradan la MEC como las metaloproteasas (MMP3 y MMP13) y consiguiente aumento del tamaño de las lagunas debido al aumento en la actividad catabólica y degradación tisular (**Figura 38A izquierda**). Aumento en los niveles de MMP3 también fueron observados en condrocitos en cultivo (**Figura 38A derecha**). Además, hemos observado que el tratamiento de diferentes cortes del mismo explante de cartílago tratado con 5 µg/mL de oligomicina desencadena en un aumento de la unión de MASL (**Figura 38B**). Para estudiar la unión de MASL al tejido, secciones de los explantes de cartílago posteriormente a su tratamiento con/sin oligomicina, se incubaron con MASL conjugado con *HiLyte Fluor TR* (rojo) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

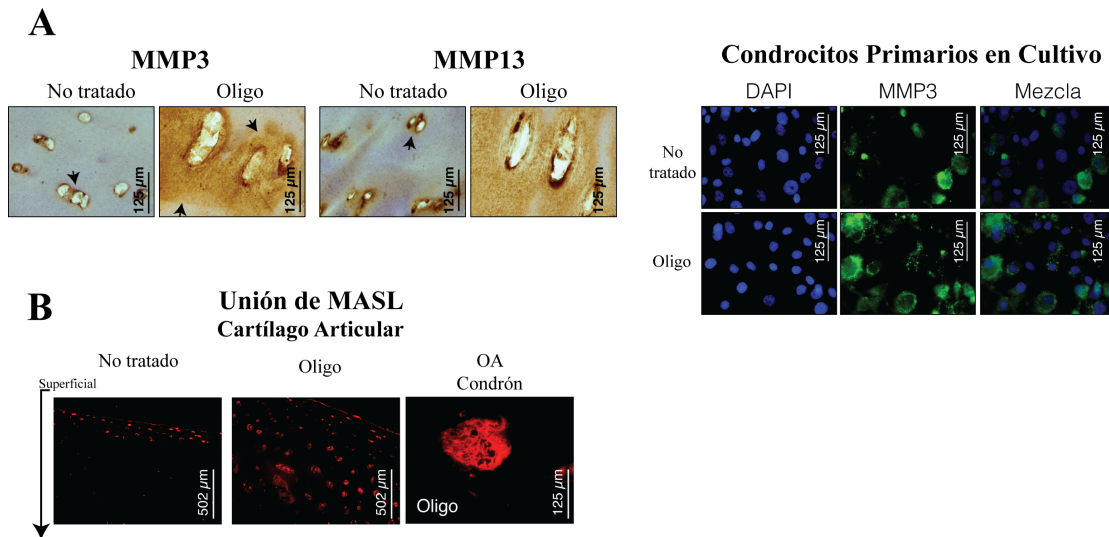


Figura 38. Efecto de la oligomicina en cartílago y condrocitos en cultivo. (A) IHQ para MMP3 y MMP13 en explantes de cartílago ($n = 4$) en presencia/ausencia de oligomicina durante 7 días. Las flechas indican positividad en zonas cercanas a las lagunas de la MEC. A la derecha se muestra las imágenes del estudio de los niveles de MMP3 en condrocitos articulares en cultivo mediante técnicas de inmunofluorescencia en presencia/ausencia de 5 μ g/mL de oligomicina durante 1 hora. (B) Las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia muestran la unión de MASL a explantes de cartílago crecidos en presencia/ausencia de oligomicina durante 7 días ($n = 4$). Secciones de 4 μ m de grosor de los explantes fueron colocados en portaobjetos e incubados con MASL conjugado con *HiLyte Fluor TR* (rojo) durante 20 minutos antes de su observación al microscopio. A la derecha se muestra una imagen de un condón conteniendo varias lagunas/condrocitos y alta positividad para MASL. La flecha indica que los cortes fueron analizados desde la capa superficial hacia la profunda. En el cartílago no tratado MASL se une más en la capa superficial, mientras que en el tratado con oligomicina se observa unión de MASL en toda su estructura. El explante de cartílago mostrado en esta figura pertenece a un paciente con grado I de OA.

El tratamiento de la línea celular T/C-28a2 y condrocitos primarios en cultivo con 5 μ g/mL de oligomicina resultó en un aumento de los niveles de ROS analizados mediante citometría de flujo. La detección de ROS fue analizada utilizando DCFH-DA. En la **figura 39A** se muestran los resultados del análisis. Sin embargo, en las células que previamente fueron tratadas con MASL, antes de añadir la oligomicina, los niveles de ROS no aumentaron a los niveles obtenidos para aquellas muestras tratadas sólo con oligomicina. El uso de diferentes concentraciones (400 y 720 nM) de MASL no aumentó los niveles de ROS con respecto a la muestra no tratadas (no tratado; sin oligomicina).

El análisis de expresión génica de mediadores proinflamatorios como IL-6 y COX-2 y factores catabólicos tales como MMP3 reveló que la presencia de oligomicina incrementa sus niveles de expresión (**Figura 39B**). Sin embargo, la presencia de concentraciones nanomolares de MASL revertió este efecto. Las células fueron tratadas en presencia/ausencia de MASL y con 5 μ g/mL de oligomicina durante 1 hora. Se analizó tanto la línea celular de condrocitos (T/C-28a2) como condrocitos en cultivo para cada una de las condiciones. La

expresión génica fue cuantificada mediante qPCR. Los cebadores utilizados en el análisis de expresión se muestran en la **tabla 5** (ver *Materiales y Métodos*).

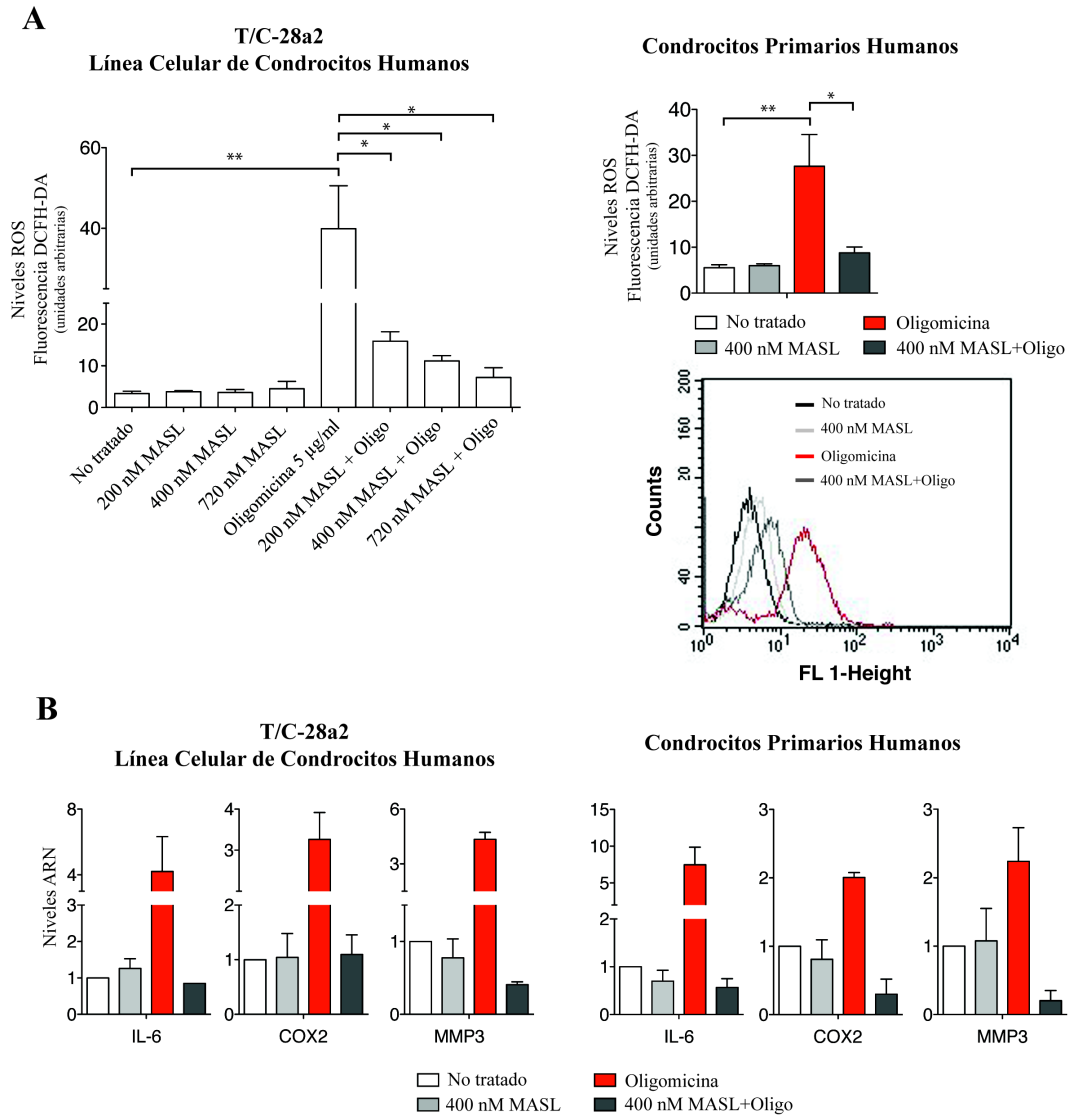


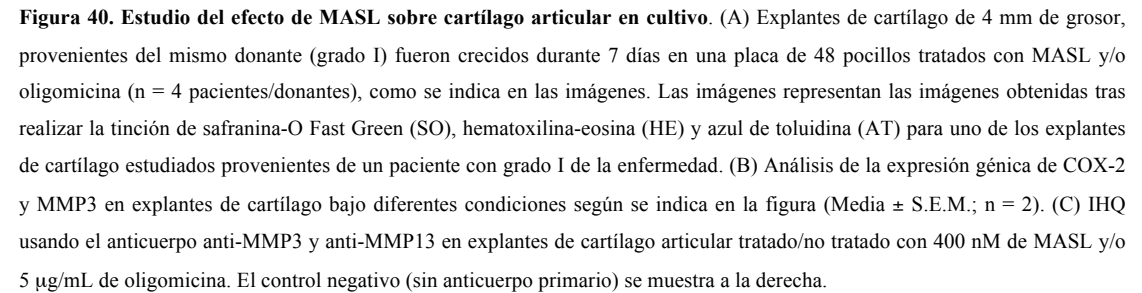
Figura 39. Efecto del tratamiento con MASL en la producción de ROS y expresión de factores catabólicos. (A) La línea de condrocitos T/C-28a2 y condrocitos primarios aislados de cartilago de pacientes con artrosis fueron tratados con diferentes concentraciones de MASL y en presencia/ausencia de 5 µg/mL de oligomicina durante 1 hora; los niveles de ROS se midieron utilizando el fluoróforo DCFH-DA y citometría de flujo. Los resultados se muestran en dos gráficos (Media ± S.E.M., n = 2 para T/C-28a2 y n = 5 para condrocitos primarios). * p<0.05, ** p<0.01. Test t-Student; test de Kruskall-Wallis y test de Dunn de comparación múltiple. (B) Análisis de la expresión génica para IL-6, COX-2 y MMP3 en T/C-28a2 y condrocitos primarios en cultivo tratados y no tratados con 400 nM de MASL y 5 µg/mL de oligomicina, según se indica en la figura (n = 2).

2.4. Efecto de MASL sobre la composición y estructura de explantes de cartílago en cultivo

Una vez demostrado el efecto protector de MASL en condrocitos primarios, decidimos estudiar si este efecto se reproducía en explantes de cartílago en cultivo. Para ello, cuatro explantes del mismo cartílago y del mismo tamaño preparados utilizando un sacabocados de 4 mm de tamaño fueron tratados durante 7 días con un medio DMEM suplementado con 0.1% SFT y 400 nM de MASL y/o 5 µg/mL de oligomicina (**Figura 40**). La composición y estructura del cartílago fue estudiado utilizando diferentes técnicas histológicas como la safranina-O Fast Green, hematoxilina-eosina y azul de toluidina.

La presencia de 5 µg/mL de oligomicina provocó degeneración de la MEC como es evidente al observar las tinciones de safranina-O Fast Green y azul de toluidina donde se observó una pérdida de coloración naranja-butano en la safranina e incremento en la coloración azul para el azul de toluidina, indicando pérdida de componentes esenciales para la estructura del tejido. Además, pudo observarse un incremento significativo en el tamaño de las lagunas (**Figura 40A**). Por otra parte, el tratamiento con MASL no afectó a la estructura y composición de la MEC, pero ejerció un efecto protector cuando el cartílago fue tratado con oligomicina (**Figura 40A**).

El análisis de la expresión génica de determinados mediadores proinflamatorios tales como COX-2 y de enzimas que degradan la matriz como la MMP3, confirmó que el tratamiento con MASL suprime el incremento en la expresión de estos genes inducidos por la adición de oligomicina (**Figura 40B**). Cuando se analizaron los niveles de las metaloproteasas (MMP3 y MMP13) en explantes de cartílago en presencia/ausencia de oligomicina y utilizando MASL, se confirmó que MASL suprime el incremento de la expresión de MMP3 y MMP13 inducida por oligomicina (**Figura 40C**). MMP3 y MMP13 se localizaron en el borde de las lagunas expandiéndose hacia la matriz en presencia de oligomicina. MASL ejerció un efecto protector al detectarse menores niveles de ambas proteínas utilizando IHQ.



2.5. Efecto de MASL utilizando como modelo de experimentación animal ratones BALC/c

Para llevar a cabo estos experimentos, se utilizaron ratones (*Mus musculus* cepa BALC/c) como modelo *in vivo* de OA/AR. La inflamación y daño articular se generaron mediante inyecciones intraarticulares con un lipopolisacárido de *Salmonella sp.* (LPS) y se estudió el efecto del MASL utilizando técnicas de microscopia óptica. Como ya se ha explicado en el apartado de *Materiales y Métodos*, se ha trabajado en todo momento siguiendo las 3 erres de experimentación animal (reemplazamiento, reducción, refinamiento).

Los resultados obtenidos en esta sección no pueden mostrarse por estar en proceso de negociación y corrección de una patente PCT registrada en Estados Unidos (USPTO).

V. DISCUSIÓN

Los organismos multicelulares han desarrollado mecanismos que permiten a las células comunicarse entre sí, tanto a través del intercambio directo de moléculas entre canales de membranas en contacto de células adyacentes como, a través de señales extracelulares que actúan como mensajeros químicos. La comunicación intercelular es un punto crítico en el desarrollo de órganos y tejidos, y juega un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis y reparación tisular. La comunicación celular a través de uniones comunicantes formadas por canales de conexinas, es el único tipo de comunicación directa descrito hasta el momento y fue primero descubierto en neuronas; como los canales responsables de la actividad de las sinapsis eléctricas. Sin embargo, en estas últimas décadas, se ha demostrado que prácticamente todas las células de organismos multicelulares expresan conexinas y que son capaces de comunicarse entre sí a través de estos canales.

Los resultados presentados para este trabajo de tesis, demostraron por primera vez que los condrocitos articulares están físicamente conectados entre sí a través de proyecciones citoplasmáticas que atraviesan la MEC, y que conectan células localizadas en lagunas distantes. Los resultados obtenidos mediante microscopía óptica y MEB (**Figuras 21A y 22 resultados**) demostraron que los condrocitos presentan al menos dos brazos citoplasmáticos que atraviesan la matriz y permiten el contacto físico entre células distantes. Las proyecciones citoplasmáticas fueron observadas también en condrocitos en cultivo (**Figura 24C**). Estos resultados explican los resultados publicados previamente por otros autores que sugerían la presencia de pequeñas extensiones citoplasmáticas y canales de comunicación¹⁶³⁻¹⁶⁶, pero que no llegaron a demostrar la conexión entre células localizadas en lagunas distantes.

Por otro lado, hemos observado que los condrocitos articulares expresan altos niveles de Cx43 en cultivo primario, (**Figura 23**) y que son capaces de formar canales funcionales y dependientes de voltaje (**Figura 26A**). Estudios previos utilizando condrocitos procedentes de diferentes especies animales ya habían observado que los condrocitos articulares expresaban conexinas y, entre ellas, la más estudiada era la Cx43. Además, comprobaron que formaban canales funcionales en cultivo en monocapa^{104,155-157,167-170}. Sin embargo, estos estudios no fueron capaces de explicar cómo células especializadas como los condrocitos expresaban proteínas implicadas en la comunicación célula-célula cuando en tejido estas células se encontraban aisladas en lagunas sin posibilidad de contacto directo. Estos autores y otros, hipotetizaron que los condrocitos localizados en la misma laguna podrían estar comunicándose a través de UC¹⁶⁷.

Sin embargo, la mayoría de los autores, enfocaron sus trabajos de investigación en el estudio de las funciones de los hemicanales que permiten el contacto de la célula con la MEC¹⁶⁷. En

el caso de este estudio, y como puede observarse en las **figura 24C y 25B**, la Cx43 se localiza en el margen de las células, en la membrana plasmática formando estructuras como collares de perlas en el borde de las lagunas. Los resultados de la localización de la Cx43 en tejido, confirmaron la presencia de puntos positivos alrededor del borde de las lagunas; pero además, pudimos observar la presencia de puntos positivos para Cx43 en el medio de la MEC (**Figura 25B**), lo que sugiere la posibilidad de la presencia de Cx43 en las proyecciones que atraviesan el tejido, al igual que ocurre en las células en cultivo, donde se detectan múltiples puntos positivos para la Cx43 dentro de las proyecciones citoplasmáticas (**Figura 24C**). La presencia de Cx43 en las proyecciones celulares, sugiere que el punto de comunicación entre dos células, o entre célula y MEC (hemicanales) puede ocurrir en cualquier lugar de la membrana plasmática, incluida la proyección celular. Los hemicanales de Cx43 intervienen en la liberación de segundos mensajeros, ATP, glutamato o NAD^+ al espacio extracelular^{171,172}. En el caso de condrocitos, se ha visto que los hemicanales podrían estar implicados en mecanotransducción^{156,157,173}.

Mediante experimentos de *dual voltage-clamp*, hemos demostrado que los condrocitos en cultivo retienen la capacidad de formar canales funcionales dependientes de voltaje formados exclusivamente por Cx43 (**Figura 26A**). Los hemicanales y UC formados por Cx43 son menos selectivos y tienen diferentes propiedades que los formados por ejemplo por Cx45 o Cx32¹⁰¹. Mientras que para condrocitos en cultivo sólo hemos detectado Cx43; cuando analizamos la expresión de Cxs en cartílago articular detectamos la presencia de Cx45, Cx32 y Cx46 en el citoplasma y en el margen de las células (**Figura 33**). Cuando un tejido expresa diferentes tipos de Cxs, éstas pueden oligomerizar formando canales homoméricos o heteroméricos, no obstante, sólo determinadas combinaciones de los 21 tipos de Cxs descritas en humanos son compatibles¹⁷⁴. Las células generalmente expresan más de un tipo de Cx y de hecho, la formación de UC heteroméricas es muy común. La interacción entre diferentes conexinas y formación de canales da lugar a canales con diferencias en la permeabilidad y conductancia de las UC lo que permite a las células regular las propiedades de esta comunicación¹⁷⁵. Debido a que los condrocitos en cartílago articular expresan diferentes tipos de conexinas, el estudio de la comunicación celular en tejido se complica, ya que existe la posibilidad que las UC o hemicanales estén formados por diferentes tipos de conexinas.

El estudio de la comunicación celular a través de hemicanales y UC, se complica más si tenemos en cuenta que los condrocitos expresan otro tipo de proteínas implicadas en comunicación celular denominadas PANX. Las PANX, al igual que las conexinas, forman canales con propiedades eléctricas similares a los hemicanales formados por conexinas, lo que complica su estudio^{82,176-181}. El análisis de la expresión de PANX en condrocitos y la

línea celular de condrocitos T/C-28a2 demostró altos niveles de expresión de la PANX1 al ser comparado con el gen de referencia HPRT1 (**Figura 28C**). Por lo que serán necesarios nuevos estudios para discernir que funciones o canales son dependientes de las panexinas y cuales de las conexinas, en este caso en cartílago articular.

Utilizando técnicas de IHQ observamos que los condrocitos de pacientes con OA presentaban niveles muy elevados de la Cx43 y Cx45. Sin embargo, no se detectaron cambios a nivel de expresión génica (**Figuras 31 y 33A**). Un incremento de los niveles de Cx43, sin incremento a nivel de ARNm, fue previamente observado en células sinoviales tratadas con IL-1 entre otros tipos celulares¹⁸². En cualquier caso, estos resultados sugieren que el incremento de los niveles proteicos de la Cx43 y Cx45, se deba a mecanismos implicados en regulación postranscripcional o bien en la estabilidad/degradación de la proteína. En el caso de las zonas no dañadas del tejido, la mayoría de los condrocitos localizados en estas regiones no contenían Cx43 y aquellos en los que se detectó la proteína, la Cx43 no estaba localizada en el margen celular; se detectó alrededor del núcleo, lo que sugiere que estas células perdieron la capacidad de comunicarse a través de canales formados por Cx43. En estos casos, se detectó Cx45 tanto en el citoplasma como en el borde de las lagunas, por lo que la comunicación celular podría estar ocurriendo a través de canales formados por Cx45 (**Figura 33A-B**)

Con el objetivo de estudiar si cambios en las MPTs que sufre la proteína, podrían explicar los niveles elevados de la Cx43 en condrocitos OA comenzamos un proyecto con el objetivo de estudiar alguna de estas MPTs en Cx43 aislada de condrocitos sanos y condrocitos provenientes de pacientes con OA. Utilizando herramientas informáticas (GlycoEP), predecimos potenciales sitios de glicosilación para la Cx43 (**Figura 34**). Sin embargo, y dado que la Cx43 se trata de una proteína de membrana y por tanto difícil de aislar, no fuimos capaces de identificar a la proteína por espectrometría de masas y por lo tanto la posibilidad de que la Cx43 esté glicosilada sigue todavía en debate. Se cree que las Cxs no sufren glicosilación en ninguno de sus dominios, sin embargo, el cartílago es un tejido que contiene gran cantidad de proteínas glicosiladas. De hecho, tanto las proteínas de la membrana de los condrocitos, como las proteínas que forman la MEC están prácticamente todas glicosiladas¹⁸³⁻¹⁸⁵, incluidas las fibras de colágeno tipo II. La glicosilación de los dominios extracelulares o citoplasmáticos de la Cx43 no sólo podría modificar la comunicación célula-célula, sino también podría afectar a su estabilidad o mecanismos de degradación proteica.

Es importante destacar que los niveles elevados de Cx43 en las zonas dañadas del tejido de pacientes con OA correlacionan con incrementos en el marcador de proliferación celular

PCNA y con un mayor número de células por laguna (condrones) y acúmulos de células en regiones superficiales del tejido coloquialmente denominado tejido fibroso de reparación (**Figura 32**). Además, resultados obtenidos utilizando cultivo primario de condrocitos sugieren que la Cx43 podría estar implicada en la regulación de proliferación celular y cambio de fenotipo que ocurre en los condrocitos OA. Diferentes grupos de investigación utilizando diferentes modelos celulares, han demostrado que la Cx43 está implicada en la regulación del ciclo celular. De hecho, la Cx43 es un potente factor supresor de tumores. En este trabajo, hemos observado que la inhibición de los canales de Cxs aumenta la expresión del inhibidor de ciclo celular p21 y disminuye la expresión de la ciclina D1 (resultado no mostrados, pendiente de protección; patente PCT). Además, la inhibición de los canales incrementa la síntesis de enzimas que degradan la MEC en OA tales como la MMP y aumenta la expresión del principal marcador de fenotipo de condrocitos articulares, colágeno tipo II (Col2A). Por lo que, alteraciones en la expresión o función de la Cx43 y sus canales podrían afectar a la síntesis proteica de los condrocitos así como a su capacidad proliferativa (**Figura 33B-C**).

Existen diferentes factores que modulan la apertura/cierre de los canales de conexinas tales como los niveles de calcio extracelular o pH. En el caso de cartílago de pacientes con OA se han detectado tanto cambios en los niveles de calcio extracelular como pH¹⁸⁶. En el caso del calcio, se ha observado acumulación de calcio alrededor de las lagunas en tejido artrósico¹⁸⁷, y disminución del pH de la MEC¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Las funciones de las conexinas en cartílago requieren estudios muy específicos porque la Cx43 presenta funciones tales como modulación de diferentes rutas de señalización, control de diferenciación celular o proliferación, que en algunos casos, son independientes de la función del canal. Estudios específicos serán necesarios para poder entender el efecto de la sobreexpresión de la Cx43 en cartílago de pacientes con OA en búsqueda de nuevas dianas terapéuticas que eviten la degeneración tisular o permitan su reparación en caso de daño.

El cartílago articular de adultos tiene la peculiaridad que no posee ni vasos sanguíneos, ni linfáticos ni está innervado. Por otra parte, los canales de conexinas ejercen una función metabólica esencial para mantener el equilibrio metabólico y homeostasis de tejidos tales como en el cerebro, hígado, al permitir el intercambio de nutrientes entre las células en contacto. El crecimiento celular y la coordinación metabólica son procesos fisiológicos regulados por la comunicación celular a través de UC⁹⁸. El acoplamiento metabólico a través de canales de conexinas juega un papel todavía más importante en aquellos tejidos avasculares como el cristalino o la córnea. En estos tejidos la red de comunicación celular a través de UC es esencial para el mantenimiento de la homeostasis del propio tejido. De hecho,

fallos en el patrón de expresión de las Cxs que afectan a la conductancia y/o ensamblaje de las proteínas para la formación de UC, han sido asociados con diferentes tipos de enfermedades como cataratas o sordera ¹⁹¹. El cartílago articular es un tejido avascular, por lo que al igual que ocurre en el cristalino y la córnea, las UC podrían estar jugando un papel fundamental para mantener los niveles de glucosa y metabolitos en todas las capas del tejido. Uno de los objetivos de este trabajo ha sido el estudio de la función metabólica de los canales de Cxs en el cartílago articular. Los resultados obtenidos utilizando ensayos de electroporación demostraron la transferencia de glucosa fluorescente entre condrocitos en contacto (**Figura 29**). No sólo hemos demostrado la capacidad que presentan los condrocitos para intercambiar metabolitos como la glucosa, sino que a través de un sistema de co-cultivo en *transwell*, demostramos que los canales de conexinas que forman los condrocitos articulares permiten el intercambio de aminoácidos esenciales tales como la lisina y la arginina (**Figura 30C**). Estos resultados ponen en evidencia que los canales de conexinas en cartílago son probablemente responsables de mantener el equilibrio metabólico en todas las zonas del tejido.

Los resultados mostrados en la **figura 27** demuestra que a través de los canales de conexinas, los condrocitos son capaces de intercambiar pequeñas moléculas de ácidos nucleicos entre los que se podrían incluir ARNip o microARN. El intercambio de pequeñas moléculas de ARN entre las células en contacto, es un mecanismo de comunicación eficaz al permitir modular e forma directa y específica la expresión de una serie de genes diana.

El sistema de co-cultivo en *transwell* no sólo ha servido para detectar la transferencia de aminoácidos entre condrocitos en contacto, sino que nos ha permitido demostrar que los condrocitos en cultivo son capaces de intercambiar péptidos y/o proteínas. Más aun, hemos demostrado que existe una red de comunicación celular que conecta a condrocitos, células de la membrana sinovial y células del hueso subcondral a través de canales de conexinas formados predominantemente por Cx43 (**Tabla 8**). Otros autores habían demostrado que tanto las células de la membrana sinovial como las del hueso subcondral expresaban Cxs y que formaban UC funcionales ¹⁶⁹. En el hueso subcondral, por ejemplo, la comunicación celular a través de UC entre osteocitos, osteoclastos y osteoblastos es esencial para la formación y remodelación ósea ⁹⁸. El hecho de que por primera vez se haya demostrado que existe una red de comunicación celular entre cartílago, membrana sinovial y hueso subcondral podría indicar que la comunicación entre las células que forman los diferentes tejidos de la articulación contribuye al mantenimiento de su homeostasis así como también sería un elemento más a tener en cuenta a la hora del estudio de mecanismos de señalización celular.

En una segunda línea de investigación hemos estudiado el efecto de cambios en el patrón de sialización de glicoproteínas en la estructura y función del cartílago articular. Los cambios del patrón de glicosilación de proteínas afectan a la estabilidad y a la función de la proteína y están relacionados con el desarrollo de diferentes enfermedades ^{123,124,192,193}. En el año 1970 fue la primera vez que se describió que las proteínas podrían contener cadenas de azúcares, sin embargo no fue hasta más tarde cuando el desarrollo de técnicas genómicas, proteómicas y de espectrometría de masas permitió su identificación y análisis. La organización macromolecular de la MEC (interacciones proteoglicano – colágeno y/o proteoglicano – proteoglicano) acompañada de la presencia de otras glicoproteínas y agua, permiten la formación de una densa y sólida matriz extracelular. Durante la OA se produce la progresiva degradación de la MEC que deriva en la pérdida de la función del tejido ^{16,21}. Cambios en la glicosilación de proteínas tanto de la MEC como de la membrana de los condrocitos se han correlacionado con procesos de degradación de la MEC y con cambios en el fenotipo del condrocito ¹⁹⁴. La sialización, o adición de ácido siálico, es una modificación que ocurre en las glicoproteínas en posición terminal y puede ocurrir en enlace α -2,3, α -2,6 o α -2,8. Varios autores han demostrado recientemente que cambios en la posición de enlace de residuos de ácido siálico de α -2,6 a α -2,3 en glicoproteínas podría estar relacionado con el desarrollo de enfermedades reumáticas ^{123,124,132}. Las lectinas se unen de forma específica a determinados azúcares y estructuras presentes en las glicoproteínas. La lectina denominada MASL, se une de forma específica a glicoproteínas que contienen ácido siálico en α -2,3 ¹⁴¹. Cuando estudiamos la presencia de glicoproteínas sializadas en α -2,3 en cartílago articular de pacientes con OA y donantes sanos, se detectó un incremento en la unión del MASL, lo que sugiere que el cartílago de los pacientes con OA poseen un mayor número de glicoproteínas sializadas en α -2,3 respecto a sanos (**Figura 36**).

En el caso de este proyecto de tesis, utilizamos la PDPN como un control de la presencia de glicoproteínas sializadas en α -2,3 en el cartílago articular ya que se caracteriza por ser un receptor de membrana altamente glicosilado y sializado en enlace α -2,3. Además, se ha publicado que la PDPN podría estar implicada en procesos que desencadenan en la aparición de enfermedades reumatológicas tales como la AR ^{160,161}. Las técnicas de IHQ revelaron que los pacientes con OA, independientemente del grado de la enfermedad, presentan un incremento en la expresión de PDPN desde la capa superficial hacia la profunda (**Figura 35**). En el cartílago sano, la PDPN se localiza en el margen de las lagunas, confirmando su posición en la membrana; sin embargo, en el cartílago OA, se localiza tanto en el margen celular como en citoplasma y probablemente en el núcleo (**Figura 35**). La función fisiológica

que ejerce la PDPN todavía está en debate, sin embargo, diferentes estudios han demostrado que podría estar jugando un papel importante en procesos de reparación tisular, procesos inflamatorios y metástasis ¹⁹⁵.

Los resultados mostrados en las **figura 36** demuestran que el cartílago de pacientes con OA presenta un incremento en la sialización de glicoproteína en enlace α -2,3. Utilizando concentraciones nanomolares de MASL que no afectaron ni a viabilidad celular, crecimiento o adhesión celular (**Figura 37**), pudimos observar el efecto protector de la lectina en cartílago articular ante una situación patológica tanto en un sistema *in vitro* como *in vivo* utilizando modelos animales.

Tanto la OA como la AR, son dos enfermedades reumáticas que presentan diferente etiología, sin embargo, en las fases agudas de la enfermedad presentan procesos similares como inflamación de la articulación, degeneración del cartilago articular y finalmente pérdida de función de la articulación ^{21,196,197}. La etiología de ambas enfermedades es diferente y actualmente desconocida. Mientras que la AR se presenta como una enfermedad con etiología autoinmune, la OA se asocia con factores degenerativos relacionados con la edad o procesos inflamatorios, existiendo gran controversia en el campo ^{198,199}.

En este estudio utilizamos oligomicina como agente inductor de daño al tratarse de un inhibidor de la ATP sintasa mitocondrial que bloquea la cadena de transporte de electrones necesaria para la fosforilación oxidativa de ADP a ATP. El uso de bajas concentraciones de oligomicina en condrocitos primarios en cultivo provocó un incremento de diez veces los niveles de ROS, un incremento en la expresión de los mediadores pro-inflamatorios, IL-6 y COX2, y de la MMP3 (**Figura 39**). Sin embargo, cuando las células fueron previamente incubadas con MASL (previamente a la adición de oligomicina), la presencia de la lectina protegió del incremento de ROS y expresión de los componentes catabólicos estudiados. Del mismo modo, cuando se trasladaron los experimentos a explantes de cartilago en cultivo, pudimos observar que el tratamiento de los explantes durante 7 días con oligomicina provocó la pérdida de proteoglicanos y degradación de la MEC, sin embargo, el efecto se revierte al añadir MASL al medio de cultivo (**Figura 40**). Estudios previos habían demostrado que diferentes factores como la IL-1 β o en TNF- α inducen cambios en el fenotipo de los condrocitos acompañados con cambios de enlace de ácido siálico de α -2,6 a α -2,3 en glicoproteínas de membrana ²⁰⁰. Sin embargo, no se había demostrado que el uso de la lectina MASL que reconoce, entre otras proteínas, a receptores de membrana sializados en α -2,3 protegía a los condrocitos articulares de la activación de los procesos inflamatorios y catabólicos tales como incrementos en los niveles de ROS, degradación tisular y activación de

citoquinas inflamatorias o MMPs que participan en el desarrollo de enfermedades reumatológicas tales como la OA y la AR.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la lectina *in vivo*, utilizamos como modelo animal ratones (*Mus musculus*) y como agente inductor de daño celular LPS. El LPS administrado a bajas concentración induce un proceso inflamatorio que desencadena en la degeneración de la articulación²⁰¹⁻²⁰³. En este proyecto de tesis no se ha podido describir la metodología, ni mostrar los resultados obtenidos debido a la presentación de alegaciones de una Patente de Invención. Los resultados obtenidos confirmaron la efectividad de la lectina MASL como agente protector ante un proceso de daño o inflamación en la articulación.

Los objetivos de este proyecto de tesis eran el estudio de posibles mecanismos moleculares responsables del desarrollo de la artrosis con el objetivo de buscar nuevas dianas terapéicas para el tratamiento de la enfermedad. Cabe destacar que, en este estudio hemos podido demostrar por primera vez que los condrocitos son capaces de comunicarse directamente entre sí a través de una red celular y canales de conexinas que además permiten el acoplamiento metabólico, y probablemente son esenciales para mantener la homeostasis y función del cartílago articular. En un segundo trabajo, hemos demostrado que los condrocitos de pacientes con OA presentan niveles elevados de la Cx43 y Cx45 y el incremento en los niveles de Cx43 podría explicar el cambio de fenotipo e incremento de proliferación que se observa en las zonas dañadas del cartilago de pacientes con OA. Por otro lado, el bloqueo de los receptores de membrana modificados en α -2,3 con ácido siálico protege al cartílago articular frente a la activación de procesos catabólicos que ocurren durante la OA u otras patologías que afectan a la articulación.

Finalmente, destacar que los resultados presentados en este proyecto de tesis hace que estemos un paso más cerca de conocer los mecanismos moleculares que dan lugar a la progresiva degradación que sufre el cartílago articular en enfermedades inflamatorias y/o degenerativas como es el caso de la OA.

VI. CONCLUSIONES

Conclusiones relacionadas con el objetivo 1:

1. Los condrocitos articulares presentan proyecciones citoplasmáticas que atraviesan la matriz extracelular y conectan células localizadas en lagunas distantes.
2. En condrocitos primarios, la comunicación intercelular ocurre a través de canales voltaje – dependientes formados exclusivamente por Cx43
3. La comunicación célula – matriz puede ocurrir a través de hemicanales formados por conexinas o panexinas.
4. Función metabólica de los canales de conexinas: los condrocitos articulares son capaces de intercambiar aminoácidos, péptidos y nutrientes esenciales como la glucosa a través de los canales formados por conexinas.
5. Los niveles de expresión de Cx43 están alterados en pacientes con OA; la sobreexpresión y/o pérdida de localización de la Cx43 y/o Cx45 puede afectar a la estructura e integridad de los condrocitos articulares.

Conclusiones relacionadas con el objetivo 2:

1. El cartílago articular de pacientes con OA presenta altos niveles de glicoproteínas sializadas en posición α -2,3.
2. El apantallamiento de los receptores sializados en posición α -2,3 con la lectina MASL, protege a los condrocitos y al cartílago articular del efecto de ROS, mediadores pro-inflamatorios y activación de las MMPs.
3. La lectina MASL protege al cartílago articular de la degradación *in vivo* bajo condiciones patológicas (modelo animal).

Conclusions related to objective 1:

1. Articular chondrocytes in cartilage contain long and thin cytoplasmic projections that travel through the extracellular matrix and physically connect with cells located in different lacunae.
2. Intercellular communication occurs through voltage – dependent gap junction channels specifically formed by Cx43 in the case of primary chondrocytes.
3. Cell - matrix communication can occur through hemichannels formed by connexins or pannexins.
4. Metabolic function of gap junction intercellular communication: Articular chondrocytes are able to exchange through gap junction channels essential amino acids, peptides and nutrients such as glucose.
5. Connexin protein levels are altered in cartilage from OA patients. The overexpression and/or loss of localization of Cx43 and/or Cx45 would affect the structural and functional integrity of chondrocytes.

Conclusions related to objective 2:

1. Articular cartilage from OA patients contains high levels of α -2,3 sialylated glycoproteins.
2. Quenching α -2,3 sialylated proteins with the specific lectin MASL protects articular chondrocytes and cartilage *in vitro* from the detrimental effects of ROS, pro-inflammatory mediators and MMPs activation.
3. The lectin MASL prevents articular cartilage degradation *in vivo* under pathological conditions (animal model).

VII. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Kamina, P. in *Anatomía general* 71-93 (1997).
- 2 Thibodeau, G. A. & Patton, K. T. in *Anatomía y Fisiología* 255-278 (2000).
- 3 Seely, Stephens & Tate. in *Anatomy & Physiology* 241-270 (2003).
- 4 Harris, T. J. & Tepass, U. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 502-514 (2010).
- 5 Benito Ruiz, P. in *Manual SER de la artrosis* 33-42 (2002).
- 6 Thonar, E. J., Masuda, K., Manicourt, D. H. & Kuettner, K. E. in *Osteoarthritis, clinical and experimental aspects* 1-19 (1999).
- 7 Hunziker, E. B. in *Articular cartilage and osteoarthritis* 183-189 (1992).
- 8 Fuentes-Boquete, I., Galdo-Fernández, F. & Blanco García, F. J. in *Seminarios de la Fundación Española de Reumatología* 3-14 (2001).
- 9 Hunziker, E. B. Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Tech* **28**, 505-519 (1994).
- 10 Mankin, H. J., Thrasher, A. Z., Weinberg, E. H. & Harris, W. H. Dissociation between the effect of bovine growth hormone in articular cartilage and in bone of the adult dog. *J Bone Joint Surg Am* **60**, 1071-1075 (1978).
- 11 Eyre, D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis research* **4**, 30-35 (2002).
- 12 Eyre, D. R., Wull, J. J. & Woods, P. in *Structural studies, articular cartilage and osteoarthritis* 119-130 (1992).
- 13 Poole, C. A., Flint, M. H. & Beaumont, B. W. Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J Orthop Res* **5**, 509-522 (1987).
- 14 Trujillo-Martín, E. in *Munual SER de las enfermedades reumáticas* 13-17 (2004).
- 15 Han, L. *et al.* Time-dependent nanomechanics of cartilage. *Biophys J* **100**, 1846-1854 (2011).
- 16 Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R. & Goldring, M. B. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* **64**, 1697-1707 (2012).
- 17 De Toro, F. J. in *Manual SER de las enfermedades reumáticas* 17-20 (2004).
- 18 Hunter, D. J. & Felson, D. T. Osteoarthritis. *Bmj* **332**, 639-642, doi:10.1136/bmj.332.7542.639 (2006).
- 19 Blanco Garcia, F. J. Osteoarthritis something is moving. *Reumatología Clínica* **10**, 4-5 (2014).
- 20 Sandell, L. J. & Aigner, T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis research* **3**, 107-113 (2001).
- 21 Goldring, M. B. & Goldring, S. R. Osteoarthritis. *J Cell Physiol* **213**, 626-634 (2007).

- 22 Verbruggen, G. & Veys, E. M. Numerical scoring systems for the anatomic evolution of osteoarthritis of the finger joints. *Arthritis Rheum* **39**, 308-320 (1996).
- 23 Felson, D. T. *et al.* Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* **40**, 728-733 (1997).
- 24 Zhang, Y. *et al.* Comparison of the prevalence of knee osteoarthritis between the elderly Chinese population in Beijing and whites in the United States: The Beijing Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* **44**, 2065-2071 (2001).
- 25 Meachim, G. & Brooke, G. in *Osteoarthritis: Diagnosis and Management* 29-42 (1984).
- 26 Howell, D. S. Pathogenesis of osteoarthritis. *The American journal of medicine* **80**, 24-28 (1986).
- 27 Adams, M. E. in *Clinical concepts in regional musculoskeletal illness* 137-167 (1987).
- 28 Hamerman, D. The biology of osteoarthritis. *The New England journal of medicine* **320**, 1322-1330 (1989).
- 29 Henrotin, Y. & Reginster, J. Y. Anabolic events in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **7**, 310-312 (1999).
- 30 Blanco Garcia, F. J. Catabolic events in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **7**, 308-309 (1999).
- 31 Goldring, M. B. & Otero, M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* **23**, 471-478 (2011).
- 32 Attur, M. G., Dave, M., Akamatsu, M., Katoh, M. & Amin, A. R. Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. *Osteoarthritis Cartilage* **10**, 1-4 (2002).
- 33 Goldring, M. B. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **43**, 1916-1926 (2000).
- 34 Blanco Garcia, F. J. Catabolic events in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* **7**, 308-309 (1999).
- 35 Lopez-Armada, M. J. *et al.* Evidencia de mecanismos inflamatorios en la osteoartritis. *Reumatología Clínica*, 23-27 (2007).
- 36 Murphy, G. *et al.* Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis research* **4 Suppl 3**, S39-49 (2002).
- 37 Cascales-Angosto, M. & Alvarez-Gomez, J. A. in *Anuales de la Real Academia Nacional de Farmacia* Vol. 76 (2010).
- 38 Billingham, R. C. *et al.* Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* **99**, 1534-1545 (1997).
- 39 Mitchell, P. G. *et al.* Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* **97**, 761-768 (1996).
- 40 Imai, K. *et al.* Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and activation of progelatinase A in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol* **151**, 245-256 (1997).

- 41 Knauper, V., Lopez-Otin, C., Smith, B., Knight, G. & Murphy, G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* **271**, 1544-1550 (1996).
- 42 Dahlberg, L. *et al.* Selective enhancement of collagenase-mediated cleavage of resident type II collagen in cultured osteoarthritic cartilage and arrest with a synthetic inhibitor that spares collagenase 1 (matrix metalloproteinase 1). *Arthritis Rheum* **43**, 673-682 (2000).
- 43 Johnson, M. L., Redmer, D. A., Reynolds, L. P. & Grazul-Bilska, A. T. Expression of gap junctional proteins connexin 43, 32, and 26 throughout follicular development and atresia in cows. *Endocrine* **10**, 43-51, (1999).
- 44 Kevorkian, L. *et al.* Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum* **50**, 131-141 (2004).
- 45 Tang, B. L. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int J Biochem Cell Biol* **33**, 33-44 (2001).
- 46 Kuno, K. & Matsushima, K. ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *J. Biol. Chem.* **273**, 13912-13917 (1998).
- 47 PORTER, S., CLARK, M., Kevorkian, L. & Edwards, D. R. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J.* **386**, 15-27 (2005).
- 48 Wang, W. M. *et al.* Transforming growth factor-beta induces secretion of activated ADAMTS-2. A procollagen III N-proteinase. *J Biol Chem* **278**, 19549-19557 (2003).
- 49 Colige, A. *et al.* Characterization and partial amino acid sequencing of a 107-kDa procollagen I N-proteinase purified by affinity chromatography on immobilized type XIV collagen. *J Biol Chem* **270**, 16724-16730 (1995).
- 50 Fernandes, R. J. *et al.* Procollagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3. Insights on dermatosparaxis. *J Biol Chem* **276**, 31502-31509 (2001).
- 51 Roughley, P. J. Articular cartilage and changes in arthritis: noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis research* **3**, 342-347 (2001).
- 52 Tortorella, M. D., Malfait, A. M., Deccico, C. & Arner, E. The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* **9**, 539-552 (2001).
- 53 Matthews, R. T. *et al.* Brain-enriched hyaluronan binding (BEHAB)/brevican cleavage in a glioma cell line is mediated by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family member. *J Biol Chem* **275**, 22695-22703 (2000).
- 54 Sandy, J. D. *et al.* Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J Biol Chem* **276**, 13372-13378 (2001).
- 55 Goldring, M. B. & Marcu, K. B. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* **11**, 224 (2009).

- 56 Pelletier, J. P., Martel-Pelletier, J. & Abramson, S. B. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* **44**, 1237-1247 (2001).
- 57 Black, R. A. *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* **385**, 729-733 (1997).
- 58 Fattahi, M. J. & Mirshafiey, A. Prostaglandins and rheumatoid arthritis. *Arthritis* **2012**, 239310 (2012).
- 59 Geng, Y., Blanco, F. J., Cornelisson, M. & Lotz, M. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in normal human articular chondrocytes. *J Immunol* **155**, 796-801 (1995).
- 60 Amin, A. R., Dave, M., Attur, M. & Abramson, S. B. COX-2, NO, and cartilage damage and repair. *Curr Rheumatol Rep* **2**, 447-453 (2000).
- 61 Yoshioka, M., Kubo, T., Coutts, R. D. & Hirasawa, Y. Differences in the repair process of longitudinal and transverse injuries of cartilage in the rat knee. *Osteoarthritis Cartilage* **6**, 66-75 (1998).
- 62 Kouri, J. B., Jimenez, S. A., Quintero, M. & Chico, A. Ultrastructural study of chondrocytes from fibrillated and non-fibrillated human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **4**, 111-125 (1996).
- 63 Guilak, F. Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **25**, 815-823 (2011).
- 64 Blanco Garcia, F. J. in *Manual SER de las enfermedades reumáticas* Ch. 57 (2004).
- 65 Hunter, D. in *Atlas of osteoarthritis* Ch. 6, 81-100 (2014).
- 66 Bellamy, N. *et al.* Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev* (2005).
- 67 Rutjes, A. W. *et al.* Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a systemic review and metaanalysis. *Annals of internal medicine* **157**, 180-191 (2012).
- 68 Richmond, J. C. Surgery for osteoarthritis of the knee. *Rheum Dis Clin North Am* **34**, 815-825 (2008).
- 69 Mosely, J. B. & Petersen, N. J. A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis. *The New England journal of medicine*, 1097-1107 (2002).
- 70 Vinken, M. *et al.* Connexins and their channels in cell growth and cell death. *Cell Signal* **18**, 592-600 (2006).
- 71 Dbouk, H. A., Mroue, R. M., El-Sabban, M. E. & Talhouk, R. S. Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell communication and signaling : CCS* **7**, 4 (2009).
- 72 Liu, H., Radisky, D. C. & Bissell, M. J. Proliferation and polarity in breast cancer: untying the Gordian knot. *Cell Cycle* **4**, 646-649 (2005).

- 73 Colomer, C., Desarmenien, M. G. & Guerineau, N. C. Revisiting the stimulus-secretion coupling in the adrenal medulla: role of gap junction-mediated intercellular communication. *Molecular neurobiology* **40**, 87-100 (2009).
- 74 Caveney, S. The role of gap junctions in development. *Annu Rev Physiol* **47**, 319-335, doi:10.1146/annurev.ph.47.03018.5.001535 (1985).
- 75 Christ, G. J., Spray, D. C., el-Sabban, M., Moore, L. K. & Brink, P. R. Gap junctions in vascular tissues. Evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone. *Circ Res* **79**, 631-646 (1996).
- 76 Bazzoni, G. & Dejana, E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* **84**, 869-901 (2004).
- 77 Nelson, C. M. & Bissell, M. J. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 287-309 (2006).
- 78 Scemes, E., Spray, D. C. & Meda, P. Connexins, pannexins, innexins: novel roles of "hemi-channels". *Pflugers Arch* **457**, 1207-1226 (2009).
- 79 D'Hondt, C., Ponsaerts, R., De Smedt, H., Bultynck, G. & Himpens, B. Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **31**, 953-974 (2009).
- 80 Dahl, G. & Locovei, S. Pannexin: to gap or not to gap, is that a question? *IUBMB life* **58**, 409-419 (2006).
- 81 Scemes, E., Suadicani, S. O., Dahl, G. & Spray, D. C. Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron Glia Biol* **3**, 199-208 (2007).
- 82 Panchin, Y. V. Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative. *The Journal of experimental biology* **208**, 1415-1419 (2005).
- 83 Baranova, A. *et al.* The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics* **83**, 706-716 (2004).
- 84 Phelan, P. *et al.* Drosophila Shaking-B protein forms gap junctions in paired *Xenopus* oocytes. *Nature* **391**, 181-184 (1998).
- 85 Yen, M. R. & Saier, M. H., Jr. Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily. *Prog Biophys Mol Biol* **94**, 5-14 (2007).
- 86 D'Hondt, C. *et al.* Regulation of connexin- and pannexin-based channels by post-translational modifications. *Biol Cell* **105**, 373-398 (2013).
- 87 Eiberger, J. *et al.* Connexin genes in the mouse and human genome. *Cell Commun Adhes* **8**, 163-165 (2001).
- 88 Sohl, G. & Willecke, K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* **62**, 228-232 (2004).

- 89 Herve, J. C., Bourmeyster, N., Sarrouilhe, D. & Duffy, H. S. Gap junctional complexes: from partners to functions. *Prog Biophys Mol Biol* **94**, 29-65 (2007).
- 90 Segretain, D. & Falk, M. M. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta* **1662**, 3-21 (2004).
- 91 Laird, D. W. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* **394**, 527-543 (2006).
- 92 Laird, D. W. The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. *J Bioenerg Biomembr* **28**, 311-318 (1996).
- 93 Li, H. *et al.* Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells. *J Cell Biol* **134**, 1019-1030 (1996).
- 94 Lin, J. S., Eckert, R., Kistler, J. & Donaldson, P. Spatial differences in gap junction gating in the lens are a consequence of connexin cleavage. *Eur J Cell Biol* **76**, 246-250 (1998).
- 95 Cottrell, G. T. & Burt, J. M. Heterotypic gap junction channel formation between heteromeric and homomeric Cx40 and Cx43 connexons. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C1559-1567 (2001).
- 96 Mese, G., Richard, G. & White, T. W. Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* **127**, 2516-2524 (2007).
- 97 Beauchamp, P. *et al.* Relative contributions of connexins 40 and 43 to atrial impulse propagation in synthetic strands of neonatal and fetal murine cardiomyocytes. *Circ Res* **99**, 1216-1224 (2006).
- 98 Kar, R., Batra, N., Riquelme, M. A. & Jiang, J. X. Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. *Arch Biochem Biophys* **524**, 2-15 (2012).
- 99 Zhou, J. Z. & Jiang, J. X. Gap junction and hemichannel-independent actions of connexins on cell and tissue functions - An update. *FEBS Lett* (2014).
- 100 Chanson, M. *et al.* Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. *Biochim Biophys Acta* **1711**, 197-207 (2005).
- 101 Goldberg, G. S., Valiunas, V. & Brink, P. R. Selective permeability of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta* **1662**, 96-101 (2004).
- 102 Valiunas, V., Gemel, J., Brink, P. R. & Beyer, E. C. Gap junction channels formed by coexpressed connexin40 and connexin43. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H1675-1689 (2001).
- 103 Spray, D. C., Ye, Z. C. & Ransom, B. R. Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. *Glia* **54**, 758-773 (2006).
- 104 Schwab, W., Hofer, A. & Kasper, M. Immunohistochemical distribution of connexin 43 in the cartilage of rats and mice. *Histochem J* **30**, 413-419 (1998).

- 105 Wang, C. M., Lincoln, J., Cook, J. E. & Becker, D. L. Abnormal connexin expression underlies delayed wound healing in diabetic skin. *Diabetes* **56**, 2809-2817 (2007).
- 106 Toubas, J. *et al.* Alteration of connexin expression is an early signal for chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* **301**, F24-32 (2010).
- 107 Yamasaki, H. *et al.* Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. *C R Acad Sci III* **322**, 151-159 (1999).
- 108 Zhang, Y. W., Morita, I., Ikeda, M., Ma, K. W. & Murota, S. Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. *Oncogene* **20**, 4138-4149 (2001).
- 109 Mann, M. & Jensen, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* **21**, 255-261 (2003).
- 110 Deribe, Y. L., Pawson, T. & Dikic, I. Post-translational modifications in signal integration. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 666-672 (2010).
- 111 Axelsen, L. N., Calloe, K., Holstein-Rathlou, N. H. & Nielsen, M. S. Managing the complexity of communication: regulation of gap junctions by post-translational modification. *Front Pharmacol* **4**, 130 (2013).
- 112 Saez, J. C. *et al.* Phosphorylation of connexin 32, a hepatocyte gap-junction protein, by cAMP-dependent protein kinase, protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur J Biochem* **192**, 263-273 (1990).
- 113 Takeda, A., Hashimoto, E., Yamamura, H. & Shimazu, T. Phosphorylation of liver gap junction protein by protein kinase C. *FEBS Lett* **210**, 169-172 (1987).
- 114 Pawson, C. T. & Scott, J. D. Signal integration through blending, bolstering and bifurcating of intracellular information. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 653-658 (2010).
- 115 Kjenseth, A. *et al.* The gap junction channel protein connexin 43 is covalently modified and regulated by SUMOylation. *J Biol Chem* **287**, 15851-15861 (2012).
- 116 Harwood, R., Grant, M. E. & Jackson, D. S. Studies on the glycosylation of hydroxylysine residues during collagen biosynthesis and the subcellular localization of collagen galactosyltransferase and collagen glucosyltransferase in tendon and cartilage cells. *Biochem J* **152**, 291-302 (1975).
- 117 Dzhabazov, B. *et al.* The major T cell epitope on type II collagen is glycosylated in normal cartilage but modified by arthritis in both rats and humans. *Eur J Immunol* **35**, 357-366 (2005).
- 118 Berg, D., Hipp, S., Malinowsky, K., B $\sqrt{\partial}$ lner, C. & Becker, K. F. Molecular profiling of signalling pathways in formalin-fixed and paraffin-embedded cancer tissues. *Eur J Cancer* **46**, 47-55
- 119 Hardingham, T. & Bayliss, M. Proteoglycans of articular cartilage: changes in aging and in joint disease. *Semin Arthritis Rheum* **20**, 12-33 (1990).

- 120 Hickery, M. S., Vilim, V., Bayliss, M. T. & Hardingham, T. E. Effect of interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha on the turnover of proteoglycans in human articular cartilage. *Biochem Soc Trans* **18**, 953-954 (1990).
- 121 Opdenakker, G., Rudd, P. M., Ponting, C. P. & Dwek, R. A. Concepts and principles of glycobiology. *FASEB J* **7**, 1330-1337 (1993).
- 122 Cummings, R. D. & Esko, J. D. Principles of Glycan Recognition. doi:NBK1950 [bookaccession] (2009).
- 123 Toegel, S. *et al.* Glycophenotyping of osteoarthritic cartilage and chondrocytes by RT-qPCR, mass spectrometry, histochemistry with plant/human lectins and lectin localization with a glycoprotein. *Arthritis Res Ther* **15**, R147 (2013).
- 124 Toegel, S. *et al.* Phenotype-related differential alpha-2,6- or alpha-2,3-sialylation of glycoprotein N-glycans in human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **18**, 240-248 (2010).
- 125 Sperandio, M. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J* **273**, 4377-4389 (2006).
- 126 Andre, S. *et al.* Tumor suppressor p16INK4a--modulator of glycomic profile and galectin-1 expression to increase susceptibility to carbohydrate-dependent induction of anoikis in pancreatic carcinoma cells. *FEBS J* **274**, 3233-3256 (2007).
- 127 Liu, G., Marathe, D. D., Matta, K. L. & Neelamegham, S. Systems-level modeling of cellular glycosylation reaction networks: O-linked glycan formation on natural selectin ligands. *Bioinformatics* **24**, 2740-2747 (2008).
- 128 Marathe, D. D., Chandrasekaran, E. V., Lau, J. T., Matta, K. L. & Neelamegham, S. Systems-level studies of glycosyltransferase gene expression and enzyme activity that are associated with the selectin binding function of human leukocytes. *FASEB J* **22**, 4154-4167 (2008).
- 129 Roth, J. Lectins for histochemical demonstration of glycans. *Histochem Cell Biol* **136**, 117-130 (2011).
- 130 Goldring, M. B. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **20**, 1003-1025 (2006).
- 131 Toegel, S. *et al.* Lectin binding studies on C-28/I2 and T/C-28a2 chondrocytes provide a basis for new tissue engineering and drug delivery perspectives in cartilage research. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **117**, 121-129 (2007).
- 132 Toegel, S. *et al.* Lectin binding patterns reflect the phenotypic status of in vitro chondrocyte models. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **45**, 351-360 (2009).
- 133 Higai, K., Ishihara, S. & Matsumoto, K. NFkappaB-p65 dependent transcriptional regulation of glycosyltransferases in human colon adenocarcinoma HT-29 by stimulation with tumor necrosis factor alpha. *Biol Pharm Bull* **29**, 2372-2377 (2006).

- 134 Takahata, M. *et al.* Sialylation of cell surface glycoconjugates is essential for osteoclastogenesis. *Bone* **41**, 77-86 (2007).
- 135 Videira, P. A. *et al.* Surface alpha 2-3- and alpha 2-6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence on endocytosis. *Glycoconj J* **25**, 259-268 (2008).
- 136 Ghazarian, H., Idoni, B. & Oppenheimer, S. B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem* **113**, 236-247 (2011).
- 137 Sharon, N. & Lis, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **14**, 53R-62R (2004).
- 138 Komath, S. S., Kavitha, M. & Swamy, M. J. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. *Organic & biomolecular chemistry* **4**, 973-988 (2006).
- 139 Rocca, D. J. Lectins as Next-Generation Mucoadhesives for Specific Targeting of the Gastrointestinal Tract. *Gastrointest Target Drug Develop* **4** (2004).
- 140 Kumar, K., Chandra, P. K., Sumanthi, J., Reddy, G. S. & Chekar, P. C. Biological role of lectins: a review. *Journal of Orofacial Sciences* **4**, 20-25 (2012).
- 141 Ochoa-Alvarez, J. A. *et al.* Plant lectin can target receptors containing sialic acid, exemplified by podoplanin, to inhibit transformed cell growth and migration. *PLoS One* **7**, e41845, (2012).
- 142 Geisler, C. & Jarvis, D. L. Effective glycoanalysis with Maackia amurensis lectins requires a clear understanding of their binding specificities. *Glycobiology* **21**, 988-993 (2011).
- 143 Goldring, M. B. *et al.* Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest* **94**, 2307-2316 (1994).
- 144 Finger, F. *et al.* Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/12. *Arthritis Rheum* **48**, 3395-3403 (2003).
- 145 Pascual Garrido, C. *et al.* Anti-apoptotic treatments prevent cartilage degradation after acute trauma to human ankle cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **17**, 1244-1251 (2009).
- 146 Goodenough, D. A., Dick, J. S., 2nd & Lyons, J. E. Lens metabolic cooperation: a study of mouse lens transport and permeability visualized with freeze-substitution autoradiography and electron microscopy. *J Cell Biol* **86**, 576-589 (1980).
- 147 Gaudier, B. *et al.* [Thyrocalcitonin: value in pediatrics (apropos of 3 cases)]. *Lille medical : journal de la Faculte de medecine et de pharmacie de l'Universite de Lille* **17**, 1427-1431 (1972).
- 148 Brink, P. R. *et al.* Evidence for heteromeric gap junction channels formed from rat connexin43 and human connexin37. *Am J Physiol* **273**, C1386-1396 (1997).
- 149 Brink, P. R., Cronin, K. & Ramanan, S. V. Gap junctions in excitable cells. *J Bioenerg Biomembr* **28**, 351-358 (1996).

- 150 Brink, P. R., Ramanan, S. V. & Christ, G. J. Human connexin 43 gap junction channel gating: evidence for mode shifts and/or heterogeneity. *Am J Physiol* **271**, C321-331 (1996).
- 151 Brink, P. R., Valiunas, V., Gordon, C., Rosen, M. R. & Cohen, I. S. Can gap junctions deliver? *Biochim Biophys Acta* **1818**, 2076-2081 (2012).
- 152 Veenstra, R. D., Wang, H. Z., Beyer, E. C. & Brink, P. R. Selective dye and ionic permeability of gap junction channels formed by connexin45. *Circ Res* **75**, 483-490 (1994).
- 153 Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V. & Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* **1**, 2856-2860 (2006).
- 154 Nelson, F. *et al.* Early post-traumatic osteoarthritis-like changes in human articular cartilage following rupture of the anterior cruciate ligament. *Osteoarthritis Cartilage* **14**, 114-119 (2006).
- 155 Jones, S. J. *et al.* The incidence and size of gap junctions between the bone cells in rat calvaria. *Anat Embryol (Berl)* **187**, 343-352 (1993).
- 156 Donahue, H. J. *et al.* Chondrocytes isolated from mature articular cartilage retain the capacity to form functional gap junctions. *J Bone Miner Res* **10**, 1359-1364 (1995).
- 157 Knight, M. M., McGlashan, S. R., Garcia, M., Jensen, C. G. & Poole, C. A. Articular chondrocytes express connexin 43 hemichannels and P2 receptors - a putative mechanoreceptor complex involving the primary cilium? *J Anat* **214**, 275-283 (2009).
- 158 Sosinsky, G. E. *et al.* Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels (Austin)* **5**, 193-197 (2011).
- 159 Ekwall, A. K. *et al.* The tumour-associated glycoprotein podoplanin is expressed in fibroblast-like synoviocytes of the hyperplastic synovial lining layer in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **13**, R40 (2011).
- 160 Del Rey, M. J. *et al.* Podoplanin-Mediated Interaction Of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts With Platelets Modulates IL-8 Expression. *Arthritis & Rheumatism* **64**, 1183 (2012).
- 161 Faré, R. *et al.* Podoplanin Expression In Rheumatoid Stroma Correlates With Lymphoid Neogenesis And Is Downregulated By Anti-TNF- Therapy. *Arthritis & Rheumatism* **64**, 1193 (2012).
- 162 Miyamoto, Y. *et al.* Podoplanin is an inflammatory protein upregulated in Th17 cells in SKG arthritic joints. *Mol Immunol* **54**, 199-207 (2013).
- 163 Bush, P. G. & Hall, A. C. The volume and morphology of chondrocytes within non-degenerate and degenerate human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **11**, 242-251 (2003).

- 164 Bush, P. G., Hall, A. C. & Macnicol, M. F. New insights into function of the growth plate: clinical observations, chondrocyte enlargement and a possible role for membrane transporters. *J Bone Joint Surg Br* **90**, 1541-1547 (2008).
- 165 Gonzalez, S., Fragoso-Soriano, R. J. & Kouri, J. B. Chondrocytes interconnecting tracks and cytoplasmic projections observed within the superficial zone of normal human articular cartilage--a transmission electron microscopy, atomic force microscopy, and two-photon excitation microscopy studies. *Microsc Res Tech* **70**, 1072-1078 (2007).
- 166 Holloway, I. *et al.* Increased presence of cells with multiple elongated processes in osteoarthritic femoral head cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **12**, 17-24 (2004).
- 167 Chi, S. S., Rattner, J. B. & Matyas, J. R. Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage. *J Anat* **205**, 363-370 (2004).
- 168 D'Andrea, P. & Vittur, F. Propagation of intercellular Ca²⁺ waves in mechanically stimulated articular chondrocytes. *FEBS Lett* **400**, 58-64 (1997).
- 169 Stains, J. P. & Civitelli, R. Gap junctions in skeletal development and function. *Biochim Biophys Acta* **1719**, 69-81 (2005).
- 170 Dealy, C. N., Beyer, E. C. & Kosher, R. A. Expression patterns of mRNAs for the gap junction proteins connexin43 and connexin42 suggest their involvement in chick limb morphogenesis and specification of the arterial vasculature. *Dev Dyn* **199**, 156-167 (1994).
- 171 Stout, C. E., Costantin, J. L., Naus, C. C. & Charles, A. C. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* **277**, 10482-10488 (2002).
- 172 Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L. & De Flora, A. Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *FASEB J* **15**, 10-12 (2001).
- 173 D'Andrea, P. *et al.* Intercellular Ca²⁺ waves in mechanically stimulated articular chondrocytes. *Biorheology* **37**, 75-83 (2000).
- 174 White, T. W. Unique and redundant connexin contributions to lens development. *Science* **295**, 319-320 (2002).
- 175 Ayad, W. A., Locke, D., Koreen, I. V. & Harris, A. L. Heteromeric, but not homomeric, connexin channels are selectively permeable to inositol phosphates. *J Biol Chem* **281**, 16727-16739 (2006).
- 176 Iwamoto, T. *et al.* Biological role of gap junction proteins in cartilage and bone development. *Journal of Oral Biosciences* **55**, 29-33 (2013).
- 177 Penuela, S. *et al.* Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins. *J Cell Sci* **120**, 3772-3783 (2007).

- 178 Richter, K., Kiefer, K. P., Grzesik, B. A., Clauss, W. G. & Fronius, M. Hydrostatic pressure activates ATP-sensitive K⁺ channels in lung epithelium by ATP release through pannexin and connexin hemichannels. *FASEB J* **28**, 45-55 (2014).
- 179 D'Hondt, C. *et al.* Pannexin channels in ATP release and beyond: an unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. *Cell Signal* **23**, 305-316 (2011).
- 180 Giaume, C., Leybaert, L., Naus, C. C. & Saez, J. C. Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Front Pharmacol* **4**, 88 (2013).
- 181 Cea, L. A. *et al.* Connexin- and pannexin-based channels in normal skeletal muscles and their possible role in muscle atrophy. *J Membr Biol* **245**, 423-436 (2012).
- 182 Niger, C., Howell, F. D. & Stains, J. P. Interleukin-1 β increases gap junctional communication among synovial fibroblasts via the extracellular-signal-regulated kinase pathway. *Biol Cell* **102**, 37-49 (2009).
- 183 Zaia, J., Liu, B., Boynton, R. & Barry, F. Structural analysis of cartilage proteoglycans and glycoproteins using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem* **277**, 94-103 (2000).
- 184 Fife, R. S., Rachow, J. W. & Ryan, L. M. Synovial fluid and plasma levels of cartilage matrix glycoprotein in arthritis. *Calcif Tissue Int* **55**, 100-102 (1994).
- 185 Canfield, A. E. *et al.* The involvement of matrix glycoproteins in vascular calcification and fibrosis: an immunohistochemical study. *J Pathol* **196**, 228-234 (2002).
- 186 Barrett-Jolley, R., Lewis, R., Fallman, R. & Mobasheri, A. The emerging chondrocyte channelome. *Front Physiol* **1**, 135 (2010).
- 187 Shimazaki, A., Wright, M. O., Elliot, K., Salter, D. M. & Millward-Sadler, S. J. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in human articular chondrocytes. *Biorheology* **43**, 223-233 (2006).
- 188 Ramage, L., Martel, M. A., Hardingham, G. E. & Salter, D. M. NMDA receptor expression and activity in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **16**, 1576-1584 (2008).
- 189 McNearney, T., Speegle, D., Lawand, N., Lisse, J. & Westlund, K. N. Excitatory amino acid profiles of synovial fluid from patients with arthritis. *J Rheumatol* **27**, 739-745 (2000).
- 190 Salter, D. M., Wright, M. O. & Millward-Sadler, S. J. NMDA receptor expression and roles in human articular chondrocyte mechanotransduction. *Biorheology* **41**, 273-281 (2004).
- 191 Mathias, R. T., White, T. W. & Gong, X. Lens gap junctions in growth, differentiation, and homeostasis. *Physiol Rev* **90**, 179-206 (2010).
- 192 Turner, G. A. N-glycosylation of serum proteins in disease and its investigation using lectins. *Clin Chim Acta* **208**, 149-171 (1992).

- 193 Schultz, M. J., Swindall, A. F. & Bellis, S. L. Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans. *Cancer Metastasis Rev* **31**, 501-518 (2012).
- 194 Moremen, K. W., Tiemeyer, M. & Nairn, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 448-462 (2012).
- 195 Wicki, A. & Christofori, G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer* **96**, 1-5 (2007).
- 196 Leah, E. Osteoarthritis: TGF-beta overload at bones of cartilage degeneration. *Nat Rev Rheumatol*, (2013).
- 197 Leah, E. Osteoarthritis: Chondroprotection by histone deacetylase inhibition. *Nat Rev Rheumatol* (2013).
- 198 Arden, N. & Nevitt, M. C. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **20**, 3-25 (2006).
- 199 Zhang, Y. & Jordan, J. M. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med* **26**, 355-369 (2010).
- 200 Pabst, M. *et al.* IL-1beta and TNF-alpha alter the glycophenotype of primary human chondrocytes in vitro. *Carbohydr Res* **345**, 1389-1393 (2010).
- 201 Scharstuhl, A., van Beuningen, H. M., Vitters, E. L., van der Kraan, P. M. & van den Berg, W. B. Loss of transforming growth factor counteraction on interleukin 1 mediated effects in cartilage of old mice. *Ann Rheum Dis* **61**, 1095-1098 (2002).
- 202 Nakayama, M. *et al.* Enhanced susceptibility to lipopolysaccharide-induced arthritis and endotoxin shock in interleukin-32 alpha transgenic mice through induction of tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Res Ther* **14**, R120 (2012).
- 203 Zhou, J. S., Xing, W., Friend, D. S., Austen, K. F. & Katz, H. R. Mast cell deficiency in Kit(W-sh) mice does not impair antibody-mediated arthritis. *J Exp Med* **204**, 2797-2802 (2007).

ANEXOS



MUSCULOSKELETAL PATHOLOGY

Human Articular Chondrocytes Express Multiple Gap Junction Proteins

Differential Expression of Connexins in Normal and Osteoarthritic Cartilage

Maria D. Mayan,^{*†} Paula Carpintero-Fernandez,^{*†} Raquel Gago-Fuentes,^{*†} Oskar Martinez-de-Illarduya,^{*‡} Hong-Zhang Wang,[§] Virginijus Valiunas,[§] Peter Brink,[§] and Francisco J. Blanco^{*†¶}

From the Osteoarticular and Aging Research Group* and the Cartilage Biology Group[†] Rheumatology Division, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, A Coruña, Spain; the CIBER-BBN/ISCIII (Biomedical Research Networking center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine/Carlos III Health Institut)[‡] and the ProteoRed/ISCIII (Carlos III Health Institut),[¶] Proteomics Group, Madrid, Spain; the Department of Physiology and Biophysics,[§] State University of New York, Stony Brook, New York

Accepted for publication
December 17, 2012.

Address correspondence to
Francisco J. Blanco, M.D., or
Maria D. Mayan, Ph.D.,
Rheumatology Division,
INIBIC-Hospital Universitario
A Coruña, Xubias de Arriba 84,
A Coruña, 15006 Spain.
E-mail: fblagar@sergas.es or
Ma.Dolores.Mayan.Santos@sergas.es.

Osteoarthritis (OA) is the most common joint disease and involves progressive degeneration of articular cartilage. The aim of this study was to investigate if chondrocytes from human articular cartilage express gap junction proteins called connexins (Cx). We show that human chondrocytes in tissue express Cx43, Cx45, Cx32, and Cx46. We also find that primary chondrocytes from adults retain the capacity to form functional voltage-dependent gap junctions. Immunohistochemistry experiments in cartilage from OA patients revealed significantly elevated levels of Cx43 and Cx45 in the superficial zone and down through the next approximately 1000 μ m of tissue. These zones corresponded with regions damaged in OA that also had high levels of proliferative cell nuclear antigen. An increased number of Cxs may help explain the increased proliferation of cells in clusters that finally lead to tissue homeostasis loss. Conversely, high levels of Cxs in OA cartilage reflect the increased number of adjacent cells in clusters that are able to interact directly by gap junctions as compared with hemichannels on single cells in normal cartilage. Our data provide strong evidence that OA patients have a loss of the usual ordered distribution of Cxs in the damaged zones and that the reductions in Cx43 levels are accompanied by the loss of correct Cx localization in the nondamaged areas. (*Am J Pathol* 2013, 182: 1337–1346; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.12.018>)

The surfaces of articulating bones are covered by articular cartilage, which is required for the smooth and painless movement of the skeleton. Osteoarthritis (OA) is a condition that is characterized by the progressive degradation of matrix components that leads to a loss of joint mobility and function accompanied by chronic pain. OA is the most common joint disorder in Western populations, and its incidence increases with age. The molecular mechanisms regulating the pathogenesis and progression of OA, however, are poorly understood, and no proven disease-modifying therapy is currently available.

In adult cartilage, the chondrocytes remain resting in a nonproliferating state, but display moderate metabolic activity and the ability to maintain the surrounding matrix.

Chondrocytes are isolated inside their lacunae and the communication between chondrocytes in the superficial zone and chondrocytes in the middle and deeper layers occurs through diffusion, although it has been reported that cultured animal primary chondrocytes and the chondrocytes

Supported in part by the Fondo Investigación Sanitaria (CIBER- CB06/01/0040 and PI 08/2028 to F.J.B.) Ministerio Ciencia e Innovación (PLE2009-0144 to F.J.B.), with additional funds from the European Regional Development Fund (European Community, to F.J.B.), the NIH (grants R01 GM088181 to V.V. and PRB-NIH RO1 GM088180 to P.R.B.), R.G.-F. received a CIBER-BBN fellowship.

M.D.M., P.C.-F., and R.G.-F. contributed equally to this work.

Disclosure: M.D.M. is an Isidro Parga Pondal researcher for Xunta de Galicia.

located in the superficial zone of adult cartilage both express Cx43,^{1–6} a protein that forms gap junction (GJ) channels and is implicated in cell-to-cell communication.

Maintenance of the homeostatic tissue balance is controlled by communication between the extracellular and intercellular networks. GJs are membrane channels that often assemble as large membrane rafts and are identified as plaques at the membrane surface. Vertebrate GJ channels are composed of proteins encoded by the connexin (Cx) gene family and consist of intercellular channels that directly connect the cytoplasm of adjacent cells.⁷ In addition to their role in providing a pathway for direct intercellular communication, hemichannels are also involved in the release and exchange of small molecules between cells and the surrounding matrix.⁸ Cells can interchange small molecules, such as metabolites (eg, ATP), nutrients (eg, glucose), second messengers (eg, IP3, Ca²⁺, or AMPc), and even synthetic oligonucleotides with a molecular weight of approximately 2 to 4 kDa. These small molecules can ultimately regulate transcription in the cell. Historically speaking, GJs were first described as those responsible for the electrical synapses in the central nervous system, however, they were subsequently found in most tissues. Actually, GJ intercellular communication is required for normal cellular functioning and for tissue development and differentiation.⁹ There are 21 expressed Cxs in humans, and each connexin may play unique roles that are not interchangeable.¹⁰ For example, in the liver, GJs serve metabolic functions and in the heart they conduct electrical signals. Cxs have been implicated in multiple cellular functions and the impairment or loss of Cx expression has been implicated in the pathogenesis of several diseases.⁹

OA is characterized by multiple molecular alterations, and most changes that occur in OA cartilage are directly related to functions controlled by Cx channels. Correct cell-matrix and cell-cell communication is essential to maintain the structural integrity and function of any tissue. In addition, GJ proteins interact with many other types of proteins in the cell, including catenins and claudins, and activate multiple molecular pathways. Actually, changes in Cx protein levels, assembly state, or localization are characteristic of a variety of Cx-dysregulated diseases.^{11–16} The aim of this work was to investigate if adult human chondrocytes express Cx proteins and contain functional gap junctions. The results presented here demonstrate that normal human adult articular chondrocytes express Cx43, Cx45, Cx46, and Cx32 in all zones of adult cartilage. Primary chondrocytes retain the capacity to form functional Cx43 gap junctions. Remarkably, we have found that cartilage from OA patients has higher levels of Cx43 and Cx45 protein in the damaged proliferative zones and that Cx43 localization is lost in the mid and deep nondamaged zones.

Materials and Methods

Cartilage Collection and Processing

Human knee and femoral head articular cartilage from adult donors was obtained after joint surgery. All patients signed

the informed consent form and the Institutional Ethics Committee (Galicia, Spain) approved the study. Cartilage from healthy persons who suffered a knee or hip fracture was obtained following the same procedure. Histological samples (from healthy and OA subjects with radiological diagnoses) were graded using a modified Mankin score¹⁷ (mean age, 70.6 years; range, 60 to 89 years; Mankin score, 0 to 13 points). A higher Mankin score corresponds to a lower structural integrity of the tissue. The samples (patients and age-matched healthy subjects) were divided into 4 groups: i) 0 to 1 indicates normal/healthy, ii) 2 to 3 indicates grade 1 early OA, iii) 4 to 5 indicates grade 2 mild OA, and iv) 6 to 13 indicated grades 3 (6 to 7) and 4 (8 to 13) severe OA. Samples for RNA isolation were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C. Primary chondrocytes were isolated as previously described.¹⁸

Primary Culture of Chondrocytes

Cells were seeded onto 100 or 162 cm² flasks for gene expression assays. Chondrocytes were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies Ltd, Madrid, Spain) supplemented with 100 µg/mL Primocin (Nucliber, Madrid, Spain) and 15% fetal calf serum (Life Technologies Ltd). Cells were grown to approximately 90% confluence.

RNA Isolation and Real-Time PCR Assays

Cultured primary chondrocytes were recovered by trypsinization and stored at –80°C. Frozen articular cartilage samples were digested in digestion buffer (200 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 5% SDS, and 100 mmol/L sodium citrate) containing proteinase K. TRIzol Reagent (Invitrogen, Paisley, UK) was added to the sample according to the manufacturer's instructions. Whole RNA was treated with DNase (RNase-free DNase; Invitrogen, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions to ensure total degradation of the DNA in the sample.

IHC Assays

In situ cartilage was frozen immediately in a Cryomold Standard using Tissue-Tek OCT Compound (Sakura, Japan) and isopentanol (BDH, Poole, UK) in liquid nitrogen and stored at –80°C. Cartilage sections were serially sectioned (4 µm) at –20°C in a Cryostat (Leica CM1510). Tissue sections were fixed with acetone (BDH) for 10 minutes at 4°C, dried at room temperature, and washed for 10 minutes with PBS with 0.1% Tween 20, pH7.6 (PBST). Before staining, endogenous peroxidase was inhibited by H₂O₂ and methanol for 10 minutes and was washed one time with PBST. Primary antibody was applied 1 hour at room temperature. After three washes of 10 minutes with PBST, sections were incubated with a peroxidase-labeled polymer conjugated to goat anti-mouse/rabbit Ig (Dako, Glostrup, Denmark) for 1 hour. After three washes with PBST,

peroxidase activity was developed using a substrate chromogen solution prepared freshly and containing 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride and H_2O_2 , (Dako). Sections were then washed in distilled water and counterstained with Gill's hematoxylin, gradually dehydrated with graded alcohols, and mounted in xylene with DePeX (SERVA, Heidelberg, Germany).

Cultured cells were seeded onto chamber slides and fixed with acetone for 10 minutes at 4°C , dried at room temperature, and washed for 10 minutes with PBST before performing the procedure previously described. Negative controls (omitting primary antibody) were performed to test the specificity of the antibody. To study cartilage morphology and verify the grade of the disease, cartilage sections were stained with H&E, Safranin O, Fast Green, Masson's trichrome, Alcian Blue-PAS, Sirius red polarization method, and toluidine blue. The slides were imaged using an Olympus BX61 microscope and a DP71 digital camera (Olympus Biosystems, Hamburg, Germany). The antibodies were procured as followed: Cx32 antibody (ab66020) from Abcam (Cambridge, UK), anti-Cx46 (sc-365394) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), anti-Cx45 (MAB3101), and anti-collagen-II (MAB1330) from Millipore Iberica (Madrid, Spain), anti-Cx43 (610062) from BD Transduction Laboratories (Madrid, Spain), and anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (NA03) from Calbiochem (Madrid, Spain). Calibration and quantification of the images was performed with AnalySISD software version 5.0 (Olympus Biosystems, Hamburg, Germany).

E-Northerns

Expression of different genes related to cell cycle and ion transport in cartilage was analyzed by electronic Northerns (E-Northerns). E-Northerns retrieved expression data from DNA sequences stored in the dbEST (Database of Expressed Sequence Tags) division of GenBank through identification using the BLAST software (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD). To search for genes expressed in normal or OA cartilage, BLAST analyses were performed using reference sequences of query genes in the GenBank dbEST database, limiting the results to matches unequivocally identified as either normal or OA cartilage. The best-characterized libraries were obtained from pools of RNA with approximately 5000 sequence clones from normal and OA cartilage.¹⁹ Putative differences in gene expression between normal and osteoarthritic cartilage were detected for several genes related to cell cycle and ion transport. The number of transcripts corresponding to *p21* and *p27* were significantly elevated in normal cartilage compared to OA. In regard to ion and transmembrane transport, overexpression of *GRID2* (glutamate receptor) was detected in normal cartilage. *GRIA2* was also detected in normal cartilage, albeit at relatively low levels. *DPP10* (a known regulator of Kv4 channels) was detected in normal cartilage but not in OA. Several cell cycle and ion channel

genes are expressed in normal and OA. The most representative differences found between normal and OA cartilage corresponded to *CDKN1A* (*p21*), *CDKN1B* (*p27*), *DPP10*, *GRIA4*, *GRID2*, *GABARAP*, *GABARAPL2*, and *GABRG2*.

Western Blot

Cell lysates were prepared from confluent monolayer cells. Equal amounts of cellular protein were resolved by 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose (Bio-Rad, Madrid, Spain) membranes.¹⁸

Electrophysiological Measurements and Dye Injections

Experiments were performed on cell pairs. A dual voltage-clamp method and whole-cell and/or perforated patch recording were used to control the membrane potential of both cells and to measure currents as previously described.^{20,21} Dye transfer through gap junctions was investigated using cell pairs and Lucifer yellow (Molecular Probes; Life Technologies Ltd).²¹

Statistical Analysis

The data were analyzed using the GraphPad Prism software version 5 (La Jolla, CA). Statistical differences between sample groups were assessed using the Student's *t*-test and Kruskal-Wallis test with Dunn's Multiple Comparison test. Significant differences are represented as $P < 0.05$ and $P < 0.01$. Data are represented as the means \pm SEM.

Results

Adult Human Primary Chondrocytes Express High Levels of Cx43 and Form Functional GJs

Despite the limitations of monolayer chondrocyte cultures, these cells have served as a useful model for the study of cartilage. Chondrocytes synthesize high levels of collagen type 2. With time, cultured chondrocytes become more fibroblastic and down-regulate type 2 collagen synthesis. To test the hypothesis that these cells maintained their original phenotype in culture at the time of our assays, collagen type 2 levels and overall cellular structure were assayed by immunohistochemistry (IHC) (Figure 1A). Quantitative gene expression analysis using real-time RT-PCR revealed that human primary chondrocytes express very high levels of Cx43 mRNA (Figure 1B). We analyzed both primary transcription (intron-exon junctions; primary transcripts; Cx43p) and the processed RNA (exon-exon; mRNA; Cx43m) (Figure 1B). Western blot analysis also showed high levels of Cx43 protein in comparison with a cell line expressing Cx43 (Figure 1C).

To test if Cx43 is found in the membrane, we used IHC coupled with Gill's hematoxylin counterstaining using a monoclonal anti-Cx43 antibody (Figure 1D). Cx43 was

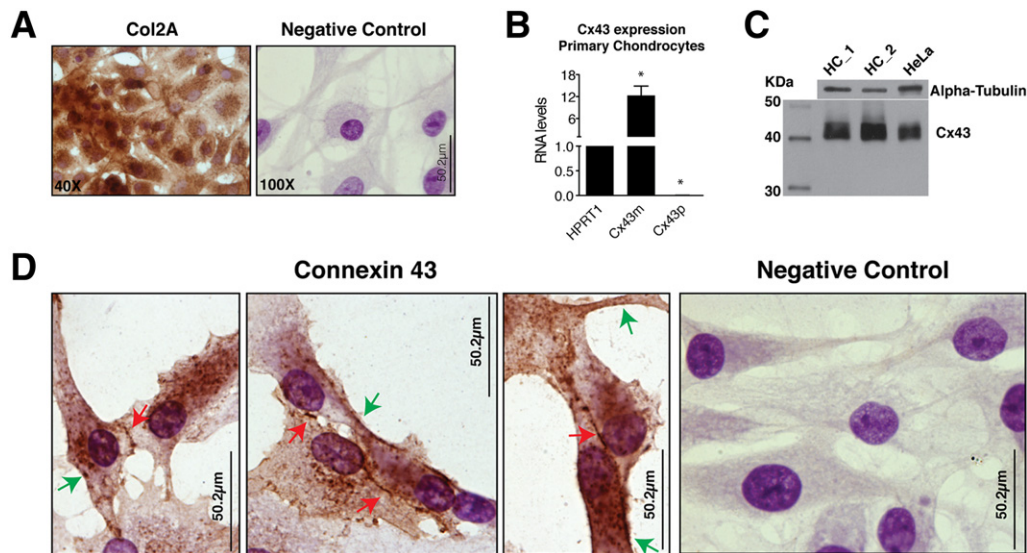


Figure 1 Human primary chondrocytes express high levels of Cx43. **A:** Primary chondrocytes cultured for 3 weeks keep their original phenotype and express high levels of collagen type 2, as detected by IHC analysis using a monoclonal anti-human type II collagen antibody. Cells were seeded onto 100 cm² flasks until confluence before being seeded onto chamber slides for 2 days and fixed with acetone. **B:** Expression analyses of hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) and Cx43 genes by real-time RT-PCR in primary chondrocytes isolated from the cartilage of healthy individuals. Data were normalized to HPRT1 levels. Note that cells accumulate high levels of Cx43 mRNA. Very low levels were detected (0.005 times relative to HPRT1), however, of primary transcription. Data are represented as means \pm SEM with $n = 4$. * $P < 0.05$; U -test, HPRT1 versus Cx43m, and HPRT1 versus Cx43p. **C:** Western blot analysis of primary chondrocytes from two healthy individuals (ie, HC-1 and HC-2). A control cell line (HeLa Cx43H10) expressing Cx43 was used. **D:** IHC analysis using the monoclonal anti-Cx43 antibody. As is shown in the negative control, this technique can differentiate the nucleus (dark purple) from the cytoplasm (clear purple). Cx43 spots in the edges of the cell surface (**green arrows**) and at the plasma membrane in cell-to-cell contact areas (**red arrows**).

mainly localized in the cytoplasm, but we could detect Cx43 between the cytoplasms of 2 adjacent cells. We also detected multiple positive spots at the edge of the cytoplasm.

To test if human primary chondrocytes are electrically coupled to each other by voltage-dependent GJ channels, we conducted a dual voltage-clamp method and whole-cell/perforated patch recording to control the membrane potential of both cell pairs and to measure currents. The results displayed in **Figure 2A** show the junctional current recordings corresponding to the typical voltage-dependent behavior pattern described for GJ channels containing Cx43. When we investigated the expression of different Cxs using primary chondrocytes from healthy joints, we only detected the expression of Cx43 and Cx45 (**Figure 2B**). We could detect low levels of Cx45 mRNA, although we did not observe any corresponding Cx45 protein signal in our IHC experiments. Analysis of the typical gap-junction-permeable dye Lucifer yellow revealed that primary chondrocytes communicate and transfer molecules through Cx channels (**Figure 2C**).

Cx43 Protein Is Overexpressed in OA Cartilage

RNA was isolated from frozen sections of cartilage tissue. Quantification using real-time PCR demonstrated that chondrocytes within cartilage expresses Cx43 mRNA (both mRNA and primary transcript) (**Figure 3A**). The pattern of expression differs from cultured chondrocytes

(**Figure 1B**), however, as in the case of tissue, we could detect both mRNA and primary transcript (Cx43p). To rule out alternative splicing, the primer sequences (**Table 1**) were compared against the GenBank Expressed Sequence Tag database. When we examined protein localization by IHC using an anti-Cx43 antibody, we observed multiple positive Cx43 spots in all layers of the healthy cartilage, including the deep zone (**Figure 3, B and C**). The population of immunopositive chondrocytes in the superficial and mid-layers of healthy cartilage was similar to that of the deeper layers (at 90% to 100% and 80% to 90% of the cell population, respectively). We found that Cx43 is localized at the margin of cells. We also detected positive spots that might correspond to connections between chondrocytes located in the same lacunae. In case of healthy cartilage, the number of positive spots per cell that were located in the edges of the lacunae varied between 4 and 10 (mean, 6.8).

In the case of cartilage from OA patients, Cx43 was found in both the nucleus and the cytoplasm, with positive spots around the edges of the lacunae (**Figure 3D**). Analysis of Cx43 using IHC followed by quantification of positive signals using the AnalysISD software version 5.0 (Olympus Biosystems) (**Figure 3E**) revealed that cartilage from OA donors showed very high levels of Cx43 positive staining (approximately 40 times more than healthy) in the 80% to 90% of cells in the superficial layer as well as in 100% of the cells in the mid-region down through 1000 μ m.

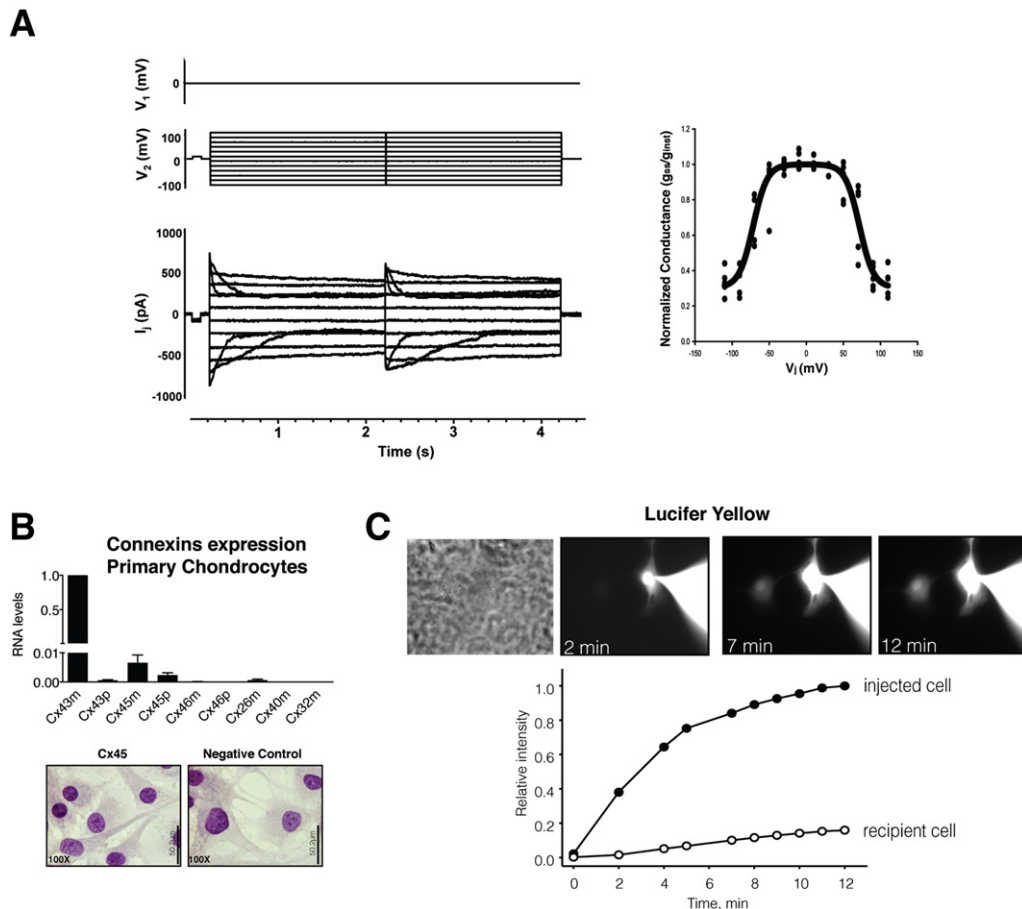


Figure 2 Human primary adult chondrocytes form functional GJs. **A:** Voltage-gating properties of human chondrocytes. Junctional currents (bottom panel) recorded from primary chondrocyte pairs excised from adult cartilage in response to a voltage step protocol (V_j) (upper panel). Cell 2 was stepped, whereas cell 1 was held at 0 mV. Summary plot of normalized junctional conductance (g_{ss}/g_{inst}) versus transjunctional voltage (V_j) obtained from five cell pairs (right panel). The measures g_{ss} and g_{inst} are the conductance measured at the end and at the beginning of the voltage pulse, respectively. The smoothed curve indicates the best fit of data to the Boltzmann equation using the following values: $V_{j,0} = 71$ mV, $g_{j,min} = 0.3$, and $z = 2.8$. The recording and data analysis showed typical voltage-dependent behavior for GJ channels containing Cx43 (means \pm SEM). **B:** The expression analysis of several Cxs by real-time RT-PCR in primary chondrocytes isolated from the cartilage of healthy individuals ($n = 6$). Data were normalized to hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 and then to Cx43m (means \pm SEM; $n = 6$). Primer sequences are shown in Table 1. **C:** Lucifer yellow flux in human chondrocyte cell pairs. A pipette containing 2 mmol/L Lucifer yellow was attached to the cell on the right in the whole cell configuration (upper panel). Epifluorescent micrographs were taken at 2, 7, and 12 minutes after dye injection into the right-sided cell. The micrographs showed a progressive fluorescence intensity increase in the recipient cell. Fluorescence intensity plots versus time for the injected cell (black circles) and the recipient cell (white circles) (lower panel). Data are represented as means \pm SEM.

The protein localization was the same in both the superficial and damaged zones, however, in the intermediate and deeper zones (where the tissue was less damaged), we detected positive spots in the edges of the lacuna in only 20% to 30% of the cell population. In the deeper zones, when the cells did show positive signals, the Cx43 was mainly localized in the cytoplasm instead of the membrane (Figure 3D).

Cartilage from OA donors showed a different grade of injury (Figure 3, B and D). Cartilage damage severity was rated (see *Materials and Methods*). The area around the articular surface and down to 100 to 1000 μ m is predisposed to be damaged in early and later grades of the disease (Figure 3B). These zones either showed severe damage or, in the case of patients with grade 1 disease, bigger lacunae. High levels of positive staining were already detected in the

first stage of OA disease (grade 1) (Figure 3D). Overall, in case of OA cartilage, the number of positive spots per cell that were located in the edges of the lacunae varied between 8 and 36 (mean, 25.1) (Figure 3F).

Increased Levels of Cx43 Correlate with Nuclear PCNA

It is important to note that we observed low levels of cytoplasmic PCNA in cartilage from healthy donors (Figure 4A). In contrast, cartilage from OA patients showed high levels of nuclear PCNA in the damaged areas, covering the superficial layer and down through ~ 1000 μ m (Figure 4A). Compared to tissue from healthy donors, the levels of Cx43 and PCNA in OA tissue were 30-fold and 4-fold higher, respectively (Figure 3E and 4B). In contrast, the less damaged intermediate-deep zone cartilage showed

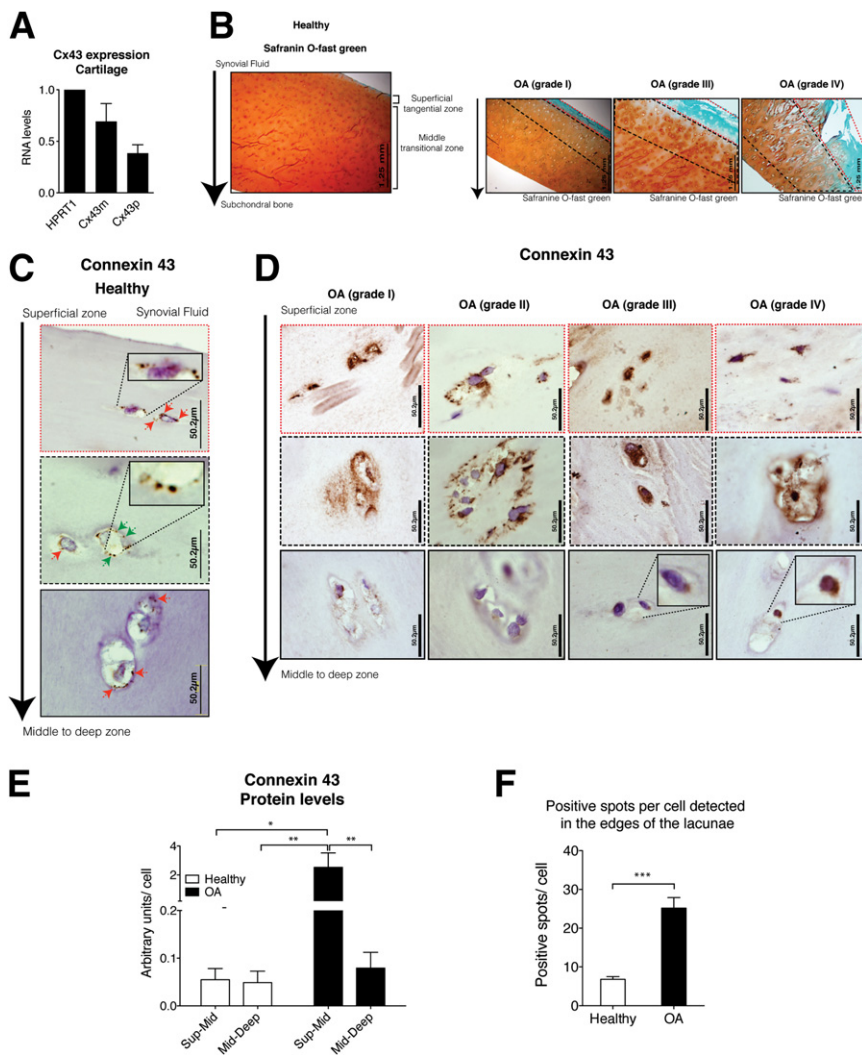


Figure 3 OA cartilage has high levels of Cx43 protein. **A:** RNA levels were determined by real-time RT-PCR and normalized to hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (means \pm SEM $n = 4$). **B:** Healthy cartilage showed homogeneous uptake of the Safranin O—fast green. The superficial zone (dashed red line). The red-orange zone (dashed black line) down to approximately 1000 μ m. In contrast, reduction of the staining and ulceration was observed in the most severe OA cartilage sections. Mankin score analyses were conducted to verify the morphology and grade of the disease. Samples were divided into 4 groups (see *Materials and Methods*). Cartilage explants were cut in the operating room immediately after surgery, and therefore all did not have identical depth. **C:** IHC analysis using an anti-Cx43 antibody. The cartilage showed here corresponds to a healthy donor. Magnifications ($\times 10$) of positive spots are shown. **D:** IHC analysis using an anti-Cx43 antibody. The cartilage showed corresponds to OA patients with different grades. Negative control (top row). **E:** Quantitative image analysis of IHC staining revealed that OA cartilage showed significantly more intense Cx43 staining in the superficial layer and down through the top 1000 μ m (Sup-mid). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ by Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test ($n = 4$ for healthy; $n = 10$ for OA; $n = 4$ for knee OA; and $n = 6$ for hip OA). **F:** Representation of the number of positive spots per cell ($n = 17$ for healthy; $n = 17$ for OA). $***P < 0.0001$; Student's t -test, healthy versus OA (means \pm SEM).

a PCNA staining pattern similar to healthy cartilage (ie, lower levels and a more cytoplasmic PCNA distribution) (Figure 4A). Very high levels of Cx43 were detected in proliferating cells that are exclusively found in the superficial layer of OA cartilage²² (Figure 4C).²²

Cx45, Cx32, and Cx46 Show Altered Levels in Cartilage from OA Patients

In cultured chondrocytes, we detected Cx45 mRNA, but no corresponding protein (Figure 2B). IHC of cartilage from healthy joints, however, showed positive signals for Cx45, Cx32, and Cx46 in all zones (Figure 5). Cx45 protein was detected in all healthy cartilage zones, especially in the superficial layer through the top 1000 μ m (Figure 5A). Cx45 formed petite positive spots around the margin of the cells, but it was diffuse in the cytoplasm (Figure 5A). In contrast, Cx45 in OA cartilage showed significantly more positive staining in the superficial and damaged areas (Figure 5, A and B), similar to what was previously observed for Cx43 and PCNA (Figure 3E and 4B). In case of OA joints, Cx45

localized in positive spots around the margin of the cells and in the nucleus but was diffuse in the cytoplasm (Figure 5A).

In the case of Cx32 and Cx46, these proteins localized around the edges of the cell and were possibly incorporated into the membrane (Figure 5C). In cartilage from patients, Cx32 was mainly found in the damaged zones and in the intermediate cartilage (Figure 5D). Cx46, however, was mainly detected in the superficial zone and in the 1000 μ m of tissue immediately beneath. Nevertheless, some OA patients showed higher levels of Cx32 and/or Cx46, whereas others were negative for both Cxs (Figure 5D). Unlike Cx43 and Cx45, we could not find distinctive patterns for either Cx32 or Cx46.

Discussion

This study demonstrates for the first time that normal human adult articular chondrocytes express several GJ proteins that are altered in OA. We have also demonstrated that human articular chondrocytes from adults retain the capacity to form functional GJs with voltage-dependent gating. The

Table 1 Sequences of the Primers Used for Quantitative Gene Expression Analysis

Gene	Target	Primer sequence
GJA1	Cx43m	5'-CAATCACTTGGCGTGACTTC-3' 5'-AACGAAAGGCAGACTGCTCA-3'
	Cx43p	5'-TTGCAATCTGTGATCCTTGAA-3' 5'-AACGAAAGGCAGACTGCTCA-3'
GJC1	Cx45m	5'-ATCTGGAAAAATTGCAATCAAAA-3' 5'-CTGTAAGGACGATCCGGAAG-3'
	Cx45p	5'-TGGGTAACCGAAGTTCTGGA-3' 5'-TCCAGGATCCAGGTAAAAACC-3'
GJA3	Cx46m	5'-GCCGGCCAGTACTTTCTGTA-3' 5'-CCTGCTTGAGCTTCTTCCAG-3'
	Cx46p	5'-ATGCCTGTCTGTGGAGAAG-3' 5'-GAAGATGAACAGCACGGTCA-3'
GJB2	Cx26m	5'-CTTCCTCCCGACGCAGAG-3' 5'-GCTCATCTCCCCACACCTC-3'
GJA5	Cx40m	5'-AAGTCCAGGGAGGAGGAAAA-3' 5'-TCGTATCACACCGGAAATCA-3'
GJB1	Cx32m	5'-TGCAGACATTCTCTGGGAAA-3' 5'-TCTCATCACCCACACACTC-3'
	HPRT-1	5'-TTGAGTTTGGAAACATCTGGAG-3' 5'-GCCCCAAGGGAAGTATAGTC-3'

The PCR products size is approximately 200 bp.
m, mRNA; p, primary transcript.

characteristic junctional current pattern obtained using electrophysiological techniques demonstrate that adult chondrocytes form functional GJs composed by Cx43. Studies conducted in tissue demonstrate that Cxs are well localized around the cell and form structures that look like pearl necklaces around the edge of the lacunae. Within tissue, chondrocytes are immersed in lacunae and because there is usually one cell per lacuna, most of these positive spots could therefore correspond to hemichannels. The

potential presence of tubular canals (termed canaculi tracks) in the tissue,²³ however, together with unpublished results from our group suggests that it is also possible that GJs are being formed. Direct cell–cell communication between paired chondrocytes have already been suggested.²⁴

Single hemichannels allow cells to interchange components with the matrix, and Cx43 has been reported to form functional hemichannels in a wide variety of mammalian cell lines.²⁵ Cx43 hemichannels were involved in the release of ATP, glutamate, or NAD⁺ in the extracellular space,^{26,27} and they have actually been implicated in the response of rabbit and bovine articular chondrocytes to mechanical loading.^{1,2,28} Hemichannels and GJs formed by Cx43 are very permissive and are therefore less selective than channels formed by Cx45 or Cx32.²⁹ Conversely, while chondrocytes found in healthy cartilage also contain Cx45, Cx32, and Cx46 in the cytoplasm, these proteins also form multiple positive spots localized around the edges of the lacunae. When cells express multiple Cxs, the Cxs can co-oligomerize into homomeric or heteromeric Cxs, although only certain combinations of the 21-member family are permitted.³⁰ Most cells express more than one Cx, and heteromeric connexons are common *in vivo*. This heterogeneity produces variations in the permeability and conductance of GJs that may allow cells to dynamically regulate their intercellular communication properties and molecular selectivity.³¹ The functional data strongly demonstrated a Cx43-dominated coupling (Figure 2), although it is possible that other functional forms are present in the tissue and provide additional methods for regulating cell–cell and cell–matrix communication.

Examining cartilage from OA donors, we found that OA patients have alterations in all studied proteins. The alterations of Cx43 and Cx45 protein levels, however, appeared to occur post-transcriptionally, as Cx transcript levels were

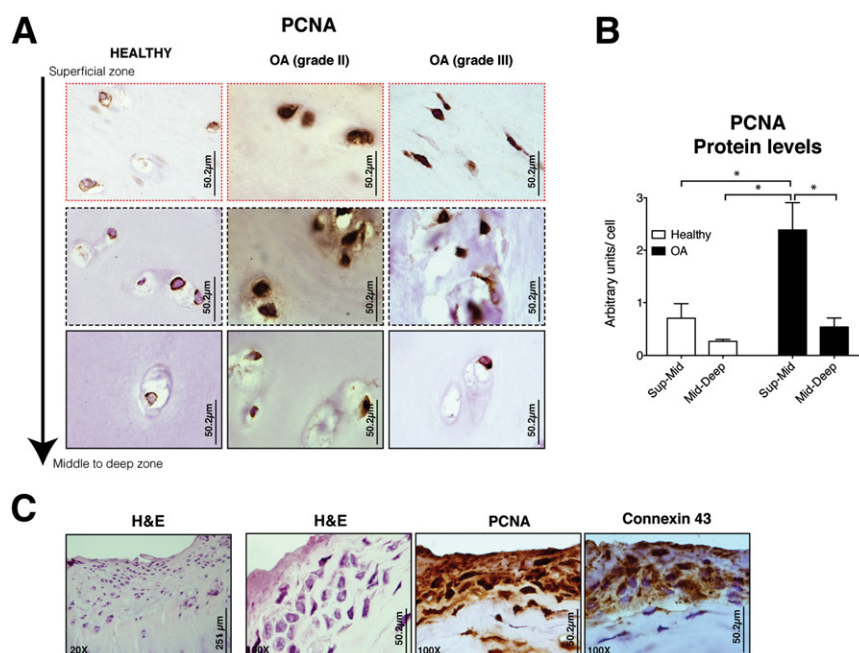


Figure 4 High levels of Cx43 protein and PCNA are observed in OA cartilage since early stage to late grades of the disease. **A:** Representative patterns of staining with PCNA. Cartilage sections from healthy joints ($n = 4$) and cartilage from OA patients ($n = 4$ for knee OA; $n = 6$ for hip OA). Negative control. **B:** Quantitative image analysis of IHC staining with PCNA is shown. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ by a Kruskal-Wallis test with a Dunn's multiple comparison test. **C:** IHC coupled with Gill's haematoxylin counterstaining using anti-Cx43 and PCNA antibody. Superficial layer grouped cells found in some of the cartilage sections from OA patients were highly positive for PCNA and Cx43 (H&E; original magnification, $\times 20$ and $\times 100$, respectively).

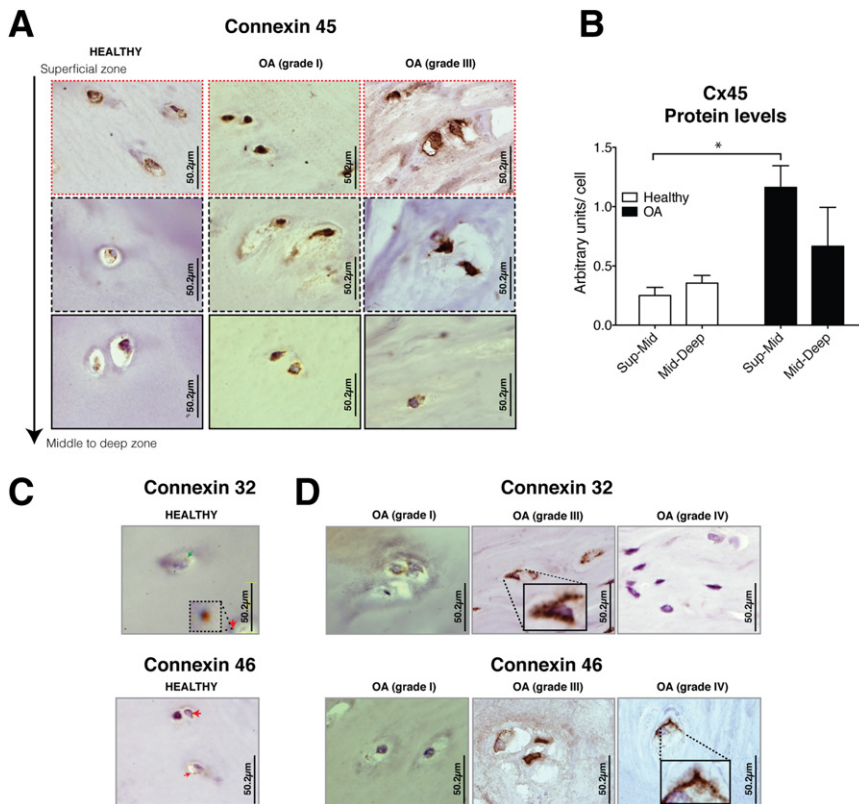


Figure 5 Human cartilage expresses Cx32, Cx46, and Cx45, all of which have altered levels in cartilage from OA joints. **A:** IHC coupled with Gill's hematoxylin counterstaining using anti-Cx45 antibody. We have observed positive signals for Cx45 in healthy cartilage and OA. **B:** Quantitative image analysis ($n = 3$ for healthy; $n = 10$ for OA) $*P < 0.05$. Kruskal-Wallis test with a Dunn's multiple comparison test. **C:** IHC using anti-Cx32 and anti-Cx46 antibodies (normal cartilage, $n = 3$). **D:** Cx32 and Cx46 were detected in cartilage from patients ($n = 4$ for knee OA; $n = 6$ for hip OA).

unaffected in OA. Increases of the Cx43 protein without corresponding increases in the transcript levels has been previously observed in synovial cells treated with IL-1.³² In the case of human articular chondrocytes, we found that the Cx43 and Cx45 proteins were already overrepresented in cartilage from patients at the very early disease stage, especially in the superficial zone and down through the top approximately 1000 μm of tissue. Both Cxs were found in the cytoplasm and formed small spots around the cells on the edges of the lacunae. In the mid-deep zones, the cells were positive for Cx43, but the localization was mainly cytoplasmic around the nucleus. These results suggest that mid-deep OA chondrocytes found in nondamaged zones express these proteins but may lack hemichannels and/or GJs composed of Cx43. Deeper cells probably communicate through Cx45 channels, as shown by our detection of Cx45 in both the cytoplasm and cell membrane. The functional deletion of a Cx isoform produces a distinct pathology and the genetic replacement of one Cx by another fails to fully compensate.^{10,33} Previous results have shown that pharmacological inhibition of connection channels reduces IL-1 β -induced metalloprotease production by synovial cells, implying that the expression of catabolic factors destroying the matrix, such as metalloproteases, are dependent on the presence of Cx43 channels.³⁴ The results here demonstrate that high levels of Cxs coincide with cartilage damage in OA.

Our results suggest a close relationship between Cx43 and proliferation. Cx expression is differently regulated between healthy proliferative primary chondrocytes and resting healthy

chondrocytes in cartilage (cultured chondrocytes showed approximately 12 times more Cx43 expression than chondrocytes in tissue) (Figures 1B and 3A). Similarly, more proliferative chondrocytes and higher levels of Cxs are both found in OA cartilage. Cartilage from OA patients showed the most radical changes in Cx protein expression in the superficial zone and down through the top approximately 1000 μm of tissue, areas in which OA changes are associated with a significant catabolic activation and upregulation of chondrocytes proliferation.³⁵ This is evidenced by increased PCNA staining in mid-region and superficial zones (Figure 4). Furthermore, although Cx43 can regulate cell cycle progression, this ability differs between cell types.^{36,37} Cx43 also regulates gene expression, and this includes the regulation of p21 and p27.^{38,39} Interestingly, the over-representation of the cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in normal cartilage (see *Materials and Methods*), suggests that healthy chondrocytes in tissue might be found mostly in the G0/G1 stage, paused likely through active inhibition of the cell cycle via p21 (WAF1/CIP1/p21) and/or p27 (Kip1). The close connection between p21/p27 and Cx43 might help to elucidate the role of Cx43 in articular chondrocyte proliferation and dedifferentiation. Conversely, the C-terminal domain of Cx43 interacts with different cell-cycle proteins,⁴⁰ making the study of the effect of Cx43 on proliferation more difficult. More studies will be necessary to fully understand the role of Cx43 in chondrocytes.

Voltage-dependent GJs are acutely regulated in response to various stimuli. Hemichannels are normally closed, but they open in response to decreases in extracellular calcium,

strong membrane depolarization, mechanical stimulation, and metabolic inhibition. All of these conditions are altered in OA cartilage.^{41–46} Moreover, articular chondrocytes express several types of potassium, calcium, sodium, and N-methyl-D-aspartate channels⁴⁷ that regulate the potential membrane and/or the ratio of intracellular and extracellular ion concentrations. The functions of these channels, however, have not been extensively studied in either normal or OA cartilage. For example, transcripts coding for different GABA receptor-related proteins were found in the cartilage (see *Materials and Methods*), and an altered response to mechanical stimulation with increased levels of glutamate has been previously reported to occur in OA.^{46,48–50} Hyperpolarization and depolarization processes affect the activity of voltage-dependent Cx gating channels. Some of these effects might be related to upstream mechanisms that lead to the alteration of the Cxs observed in OA. Others might be related to the distant downstream responses of early or late events involved in cell transformation.

This study demonstrates that adult chondrocytes from humans are able to communicate with each other through GJ channels specifically formed by Cx43. Normal human adult articular chondrocytes within tissue express Cx43, Cx45, Cx46, and Cx32 in all zones of adult cartilage. Our results show a pathological increase of Cx43 and PCNA in superficial and damaged cartilage from OA donors, and it is tempting to speculate that cell proliferation may be regulated via p21/p27. The important finding of this study, however, was that Cxs are altered in OA cartilage, with Cx43 and Cx45 overrepresented in the damaged zones and Cx43 delocalized from the membrane in the nondamaged zones. The overexpression and/or loss of localization of these proteins would affect the structural and functional integrity of chondrocytes and may help explain the degeneration of the matrix that is observed in OA patients.¹¹

Acknowledgments

We thank Purificación Filgueira-Fernández and Noa Goyanes for collecting and storing cartilage samples, preparing the samples, and for IHC experiments, Lourdes Sanjurjo and Maria Dolores Salinas Bujan for generously taking cartilage samples after surgery, Maria Jose Sanchez Dopico and Tamara Hermida for isolating articular chondrocytes from cartilage for cell culture, Mar Haz Conde and Maria Vazquez for technical advice regarding RNA isolation from tissue, Emma Rodriguez and Estefania Cives for administrative help during the whole process, and Isacc Fuentes and Moises Blanco for helpful discussions.

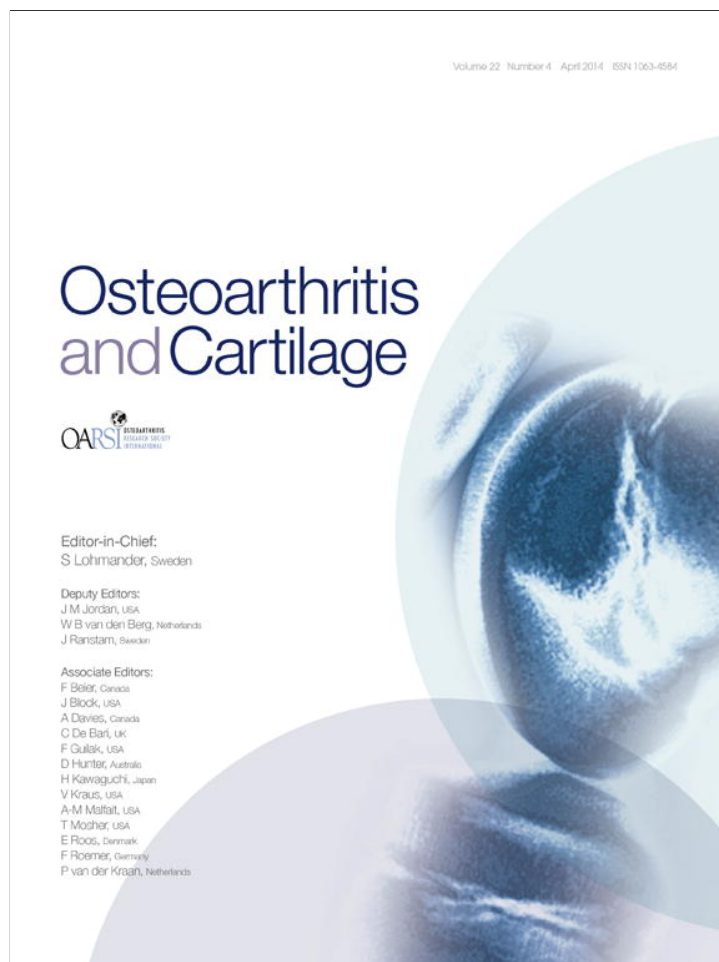
All authors were involved in drafting the article and revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version for publication. F.J.B. and M.D.M. have full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity and the accuracy of the data presented. Study conception and project planning

by M.D.M. and F.J.B. Acquisition of data by M.D.M., P.C.-F., R.G.-F., O.M.-d.-I., H.-Z.W., V.V., P.B., and F.J.B. Analysis and interpretation of data by M.D.M., V.V., P.B., and F.J.B. Manuscript writing by M.D.M. and F.J.B.

References

- Donahue HJ, Guilak F, Vander Molen MA, McLeod KJ, Rubin CT, Grande DA, Brink PR: Chondrocytes isolated from mature articular cartilage retain the capacity to form functional gap junctions. *J Bone Miner Res* 1995, 10:1359–1364
- Knight MM, McGlashan SR, Garcia M, Jensen CG, Poole CA: Articular chondrocytes express connexin 43 hemichannels and P2 receptors — a putative mechanoreceptor complex involving the primary cilium? *J Anat* 2009, 214:275–283
- Schwab W, Hofer A, Kasper M: Immunohistochemical distribution of connexin 43 in the cartilage of rats and mice. *Histochem J* 1998, 30: 413–419
- D'Andrea P, Vittur F: Propagation of intercellular Ca²⁺ waves in mechanically stimulated articular chondrocytes. *FEBS Lett* 1997, 400: 58–64
- Jones SJ, Gray C, Sakamaki H, Arora M, Boyde A, Gourdie R, Green C: The incidence and size of gap junctions between the bone cells in rat calvaria. *Anat Embryol (Berl)* 1993, 187:343–352
- Stains JP, Civitelli R: Gap junctions in skeletal development and function. *Biochim Biophys Acta* 2005, 1719:69–81
- Sohl G, Willecke K: Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 2004, 62:228–232
- Burra S, Jiang JX: Regulation of cellular function by connexin hemichannels. *Int J Biochem Mol Biol* 2011, 2:119–128
- Laird DW: Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 2006, 394:527–543
- Plum A, Hallas G, Magin T, Dombrowski F, Hagendorff A, Schumacher B, Wolpert C, Kim J, Lamers WH, Evert M, Meda P, Traub O, Willecke K: Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr Biol* 2000, 10:1083–1091
- Talhok RS, Zeinieh MP, Mikati MA, El-Sabban ME: Gap junctional intercellular communication in hypoxia-ischemia-induced neuronal injury. *Prog Neurobiol* 2008, 84:57–76
- Wang CM, Lincoln J, Cook JE, Becker DL: Abnormal connexin expression underlies delayed wound healing in diabetic skin. *Diabetes* 2007, 56:2809–2817
- Fernandez-Cobo M, Gingalewski C, De Maio A: Expression of the connexin 43 gene is increased in the kidneys and the lungs of rats injected with bacterial lipopolysaccharide. *Shock* 1998, 10:97–102
- Toubas J, Beck S, Pageaud AL, Huby AC, Mael-Ainin M, Dussaule JC, Chatziantoniou C, Chadjiachristos CE: Alteration of connexin expression is an early signal for chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 301:F24–F32
- De Vuyst E, Boengler K, Antoons G, Sipido KR, Schulz R, Leybaert L: Pharmacological modulation of connexin-formed channels in cardiac pathophysiology. *Br J Pharmacol* 163:469–483
- Green CR, Nicholson LF: Interrupting the inflammatory cycle in chronic diseases — do gap junctions provide the answer? *Cell Biol Int* 2008, 32:1578–1583
- Pascual Garrido C, Hakimiyan AA, Rappoport L, Oegema TR, Wimmer MA, Chubinskaya S: Anti-apoptotic treatments prevent cartilage degradation after acute trauma to human ankle cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2009, 17:1244–1251
- Ruiz-Romero C, Carreira V, Rego I, Remeseiro S, Lopez-Armada MJ, Blanco FJ: Proteomic analysis of human osteoarthritic chondrocytes reveals protein changes in stress and glycolysis. *Proteomics* 2008, 8:495–507
- Kumar S, Connor JR, Dodds RA, Halsey W, Van Horn M, Mao J, Sathe G, Mui P, Agarwal P, Badger AM, Lee JC, Gowen M, Lark MW: Identification and initial characterization of 5000 expressed sequenced

- tags (ESTs) each from adult human normal and osteoarthritic cartilage cDNA libraries. *Osteoarthritis Cartilage* 2001, 9:641–653
20. Valiunas V, Gemel J, Brink PR, Beyer EC: Gap junction channels formed by coexpressed connexin40 and connexin43. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001, 281:H1675–1689
 21. Valiunas V, Beyer EC, Brink PR: Cardiac gap junction channels show quantitative differences in selectivity. *Circ Res* 2002, 91: 104–111
 22. Holloway I, Kayser M, Lee DA, Bader DL, Bentley G, Knight MM: Increased presence of cells with multiple elongated processes in osteoarthritic femoral head cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2004, 12: 17–24
 23. Gonzalez S, Fragosio-Soriano RJ, Kouri JB: Chondrocytes interconnecting tracks and cytoplasmic projections observed within the superficial zone of normal human articular cartilage — a transmission electron microscopy, atomic force microscopy, and two-photon excitation microscopy studies. *Microsc Res Tech* 2007, 70:1072–1078
 24. Chi SS, Rattner JB, Matyas JR: Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage. *J Anat* 2004, 205:363–370
 25. Saez JC, Schalper KA, Retamal MA, Orellana JA, Shoji KF, Bennett MV: Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells. *Exp Cell Res* 316:2377–2389
 26. Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC: Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* 2002, 277:10482–10488
 27. Bruzzone S, Guida L, Zocchi E, Franco L, De Flora A: Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *FASEB J* 2001, 15:10–12
 28. D'Andrea P, Calabrese A, Capozzi I, Grandolfo M, Tonon R, Vittur F: Intercellular Ca²⁺ waves in mechanically stimulated articular chondrocytes. *Biorheology* 2000, 37:75–83
 29. Goldberg GS, Valiunas V, Brink PR: Selective permeability of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1662:96–101
 30. White TW, Bruzzone R, Wolfram S, Paul DL, Goodenough DA: Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins. *J Cell Biol* 1994, 125:879–892
 31. Ayad WA, Locke D, Koren IV, Harris AL: Heteromeric, but not homomeric, connexin channels are selectively permeable to inositol phosphates. *J Biol Chem* 2006, 281:16727–16739
 32. Niger C, Howell FD, Stains JP: Interleukin-1 β increases gap junctional communication among synovial fibroblasts via the extracellular-signal-regulated kinase pathway. *Biol Cell* 102:37–49
 33. White TW: Unique and redundant connexin contributions to lens development. *Science* 2002, 295:319–320
 34. Kolomytkin OV, Marino AA, Waddell DD, Mathis JM, Wolf RE, Sadasivan KK, Albright JA: IL-1 β -induced production of metalloproteinases by synovial cells depends on gap junction conductance. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, 282:C1254–C1260
 35. Pfander D, Kortje D, Weseloh G, Swoboda B: [Cell proliferation in human arthrotic joint cartilage]. German. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2001, 139:375–381
 36. Jiang JX, Gu S: Gap junction- and hemichannel-independent actions of connexins. *Biochim Biophys Acta* 2005, 1711:208–214
 37. Gramsch B, Gabriel HD, Wiemann M, Grummer R, Winterhager E, Bingmann D, Schirmacher K: Enhancement of connexin 43 expression increases proliferation and differentiation of an osteoblast-like cell line. *Exp Cell Res* 2001, 264:397–407
 38. Herrero-Gonzalez S, Gangoso E, Giaume C, Naus CC, Medina JM, Tabernero A: Connexin43 inhibits the oncogenic activity of c-Src in C6 glioma cells. *Oncogene* 29:5712–5723
 39. Zhang YW, Morita I, Ikeda M, Ma KW, Murota S: Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. *Oncogene* 2001, 20:4138–4149
 40. Giepmans BN: Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res* 2004, 62:233–245
 41. Chowdhury TT, Appleby RN, Salter DM, Bader DA, Lee DA: Integrin-mediated mechanotransduction in IL-1 β stimulated chondrocytes. *Biomech Model Mechanobiol* 2006, 5:192–201
 42. Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K: Monoiodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol* 2003, 31:619–624
 43. Kontinen YT, Mandelin J, Li TF, Salo J, Lassus J, Liljestrom M, Hukkanen M, Takagi M, Virtanen I, Santavirta S: Acidic cysteine endoprotease cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002, 46: 953–960
 44. Millward-Sadler SJ, Wright MO, Flatman PW, Salter DM: ATP in the mechanotransduction pathway of normal human chondrocytes. *Biorheology* 2004, 41:567–575
 45. Millward-Sadler SJ, Wright MO, Lee H, Caldwell H, Nuki G, Salter DM: Altered electrophysiological responses to mechanical stimulation and abnormal signalling through $\alpha 5 \beta 1$ integrin in chondrocytes from osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2000, 8:272–278
 46. Ramage L, Martel MA, Hardingham GE, Salter DM: NMDA receptor expression and activity in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2008, 16:1576–1584
 47. Barrett-Jolley R, Lewis R, Fallman R, Mobasheri A: The emerging chondrocyte channelome. *Front Physiol* 2010, 1:135
 48. McNearney T, Speegle D, Lawand N, Lisse J, Westlund KN: Excitatory amino acid profiles of synovial fluid from patients with arthritis. *J Rheumatol* 2000, 27:739–745
 49. Salter DM, Wright MO, Millward-Sadler SJ: NMDA receptor expression and roles in human articular chondrocyte mechanotransduction. *Biorheology* 2004, 41:273–281
 50. Shimazaki A, Wright MO, Elliot K, Salter DM, Millward-Sadler SJ: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in human articular chondrocytes. *Biorheology* 2006, 43:223–233



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>

Osteoarthritis and Cartilage



Brief Report

Biochemical evidence for gap junctions and Cx43 expression in immortalized human chondrocyte cell line: a potential model in the study of cell communication in human chondrocytes



R. Gago-Fuentes^{†,a}, P. Carpintero-Fernandez^{†,a}, M.B. Goldring[‡], P.R. Brink[§],
M.D. Mayan^{†,**}, F.J. Blanco^{†||¶*}

[†] Cartilage Biology Research Group, Rheumatology Division, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, Xubias de Arriba 84, 15006 A Coruña, Spain

[‡] Tissue Engineering Repair and Regeneration Program, The Hospital for Special Surgery, Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA

[§] Department of Physiology and Biophysics, State University of New York, Stony Brook, NY, USA

^{||} Rheumatology Division, ProteoRed/ISCIII, Proteomics Group, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, Xubias de Arriba 84, 15006 A Coruña, Spain

[¶] Rheumatology Division, CIBER-BBN/ISCIII, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, Xubias de Arriba 84, 15006 A Coruña, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 August 2013

Accepted 6 February 2014

Keywords:

Hemichannels

Gap junction

Cx43

Articular chondrocyte

Cartilage

T/C-28a2

SUMMARY

Objective: The development of chondrocytic cell lines has enabled the investigation of the role of cellular phenotype and mechanisms in articular cartilage biology and physiopathology of several rheumatic diseases. Among them, the T/C-28a2 cell line has become a common tool in cartilage research. Recent results from our group have revealed that primary human chondrocytes in tissue and in monolayer culture contain high levels of connexin 43 (Cx43) and are able to directly communicate through gap junction (GJ) channels. These results challenge the existing thesis of cartilage physiology, that chondrocytes do not have the capacity to physically communicate with each other. Established cell lines offer the advantage of convenience and uniformity; however, the establishment process may cause a disruption of GJ. This study was performed to investigate if T/C-28a2 cells contain Cx43 protein and form functional channels.

Methods: Cx43 was characterized by RT-qPCR, Western blotting, and immunohistochemistry (IHC). Electrophysiology experiments, Lucifer Yellow (LY) uptake, electroporation *in situ* and scrape loading assay were performed to test the functionality of GJs.

Results: T/C-28a2 cells express Cx43. Electrophysiology experiments and LY uptake confirmed the capacity of these cells to communicate through GJ channels, although these cells contain significant levels of active c-Src kinase, presumably due to their immortalization with the Simian Virus 40 large T antigen. The results were validated using primary chondrocytes (PC).

Conclusions: These results reveal that the T/C-28a2 line may provide a useful *in vitro* model for the study of Cx43 function and cell communication to understand the physiology of chondrocytes and cartilage.

© 2014 Osteoarthritis Research Society International. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Address correspondence and reprint requests to: F.J. Blanco, Rheumatology Division, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, Xubias de Arriba 84, 15006 A Coruña, Spain. Tel: 34-981-176399; Fax: 34-981-176398.

** Address correspondence and reprint requests to: M.D. Mayan, Cartilage Biology Research Group, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, Xubias de Arriba 84, 15006 A Coruña, Spain. Tel: 34-981-176399; Fax: 34-981-176398.

E-mail addresses: Ma.Dolores.Mayan.Santos@sergas.es (M.D. Mayan), fblagar@sergas.es (F.J. Blanco).

^a These authors contributed equally to this work.

Introduction

Articular cartilage is a highly specialized connective tissue with special mechanical properties that provides a smooth and frictionless surface essential for the pain-free function of joints. Adult cartilage is avascular and mainly composed of a dense extracellular matrix (ECM). Articular chondrocytes survive in this challenging environment embedded in small cavities called lacunae. Chondrocytes respond to mechanical stimuli, growth factors and cytokines and are responsible for the formation and maintenance of the integrity of the ECM. Recent results from our group revealed for the first time that chondrocytes embedded in the cartilage matrix contain at least two long cytoplasmic arms that spread along the

matrix and reach a distant cell located in a different lacuna¹. Although some authors had already suggested the presence of cytoplasmic projections, no previous studies have directly observed intercellular connections between distant chondrocytes in the cartilage matrix². The intercellular communication occurs through channels formed by connexin 43 (Cx43), called Gap Junctions (GJ)^{1,3}. The results revealed that the three-dimensional cellular network mediated by GJ is involved in the synchronised regulation of the metabolic and physiologic cartilage homeostasis¹.

Connexins constitute a large family of trans-membrane proteins that allow (a) intercellular communication through GJ channels *via* direct transfer of ions, nutrients and small signalling molecules, (b) ECM–cell communication through single membrane spanning channels, so-called hemichannels, and (c) channel-independent functions upon cell proliferation and growth. Connexins are critical for cell metabolism, differentiation, and development and they play a major role in malignant transformation. Articular chondrocytes express Cx43 and form functional GJ and hemichannels⁴. In addition, previously reported results have implicated Cx43 hemichannels in the responses of rabbit and bovine articular chondrocytes to mechanical loading^{5,6}.

Connexin mutations, altered expression, or impaired GJ function are characteristic of several diseases. Besides, upregulation of Cx43 has been observed in inflammatory conditions in several tissues and on proliferative cells in damaged zones of cartilage from patients with osteoarthritis (OA)⁴. Because of the potential role of Cx43 in inflammation, tissue degeneration, and in OA disease processes, the development of appropriate *in vitro* models is pivotal for the understanding of the roles of Cx43 in chondrocyte physiology and pathology. Several cell lines have been used as convenient *in vitro* models to investigate chondrocyte functions and alterations related with disease⁷. However, given the existence of GJ intercellular communication (GJIC) in adult cartilage, it is important to use an *in vitro* model capable of reproducing the function of these channels. The results presented here demonstrate that the T/C-28a2 human cell line contains functional connexin channels, indicating that these cells may offer a useful model to study chondrocyte and cartilage physiology.

Methods

Cartilage collection and processing, primary culture of chondrocytes, RNA isolation, and real-time PCR assays, immunohistochemistry (IHC) and Western blotting were performed as previously described^{1,4}. Cells were pelleted to obtain micromass and cultured in 15-ml conical tubes for 7 days using DMEM supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS). Cx43 antibody and total c-Src antibody were purchased from Santa Cruz Biotechnology (sc-6560 and sc-19, Santa Cruz, CA). α -tubulin antibody from Sigma (T9026, St. Louis, MO) and Phospho-Src (Tyr416) antibody from Cell Signaling Technology (2101, Danvers, MA). Cx43 antibody used for IHC was purchased from BD Transduction Laboratories (610062, MA, USA). Primers used were specific for Cx43 (5'-CAATC ACTTGGCGTGAATTC-3' and 5'-AACGAAAGGCAGACTGCTCA-3') and for miRNA1-1 (5'-GGCGTCCCGGGGTC-3' and 5'-TGTGGAGTGCC CCTCAGT-3'). T/C-28a2 cells were cultured in DMEM supplemented with 100 μ g/ml Primocin (InvivoGen Primocin™, California, USA) and 15% FCS (Life Technologies Ltd, Madrid, Spain). The presence of functional hemichannels was evaluated by uptake of Lucifer Yellow (LY) (Cell Projects Ltd® Kent, UK). LY (*Mr* of 547 Da) does not enter in living cells except through hemichannels or GJ. Briefly, cells were washed with PBS containing 2 mM EGTA and immediately incubated with PBS containing 0.4% LY for 30 min at 37°C. Cells were then washed with PBS supplemented with 10% dialysed FBS (Silantes, Munich, Germany) and 3.2 mM CaCl₂ and viewed under a fluorescent microscope (Nikon Eclipse Ti and NIS-Elements

software) to determine the number of fluorescent cells as a measure of dye uptake. Cell viability was measured using trypan blue excision method. Viability was always greater than 98%. LY dye coupling assay to test the functionality of GJs was performed using different techniques. Electrophysiological measurements and dye injections were performed as previously reported⁴. Electroporation *in situ* (InSitu Porator, Cell Projects Ltd® Kent, UK) was carried out as before described^{1,8}. For scrape loading assay, cells were seeded on 12-well plates and cultured until the confluence reached 70–100%. Cells were rinsed two times with PBS and then three scrapes were made using a needle, a tip, and a scalpel in the presence of 0.4% LY in PBS. Cells were incubated for 3 min at 37°C. After washing with a PBS containing 10% dialysed FBS, dye transfer was captured using Nikon Eclipse Ti fluorescent microscope and NIS-Elements software. The distance of dye transfer from cutting site to the farthest visual uptake of dye indicates the GJ connectivity in cells. Cells were treated with the Cx43 mimetic peptide blocker GAP27 as previously reported¹. Data were analysed using GraphPad Prism software (version 5.00). Significant differences between sample groups were assessed using Student's *t* test and the Mann–Whitney test. Significant differences are represented as **P* < 0.05 and ***P* < 0.01. Data are presented as the mean \pm S.D. *n* represents the number of independent experiments. In case of primary chondrocytes (PC) *n* is the number of independent experiments using chondrocytes from different donors.

Results

Quantitative gene expression analysis using real-time RT-PCR revealed that the T/C-28a2 cell line expresses low levels of Cx43 mRNA in comparison with human PC isolated from articular cartilage from adult donors [Fig. 1(A)]. Western blot experiments showed the presence of Cx43 protein in T/C-28a2 cells [Fig. 1(B)]. To examine the localization of Cx43, we conducted IHC experiments coupled with Gill's haematoxylin counterstaining using a monoclonal anti-Cx43 antibody and cells in monolayer and 3D cultures [Fig. 1(B)]. Cx43 was mainly localized in the cytoplasm and in at the cell-margins between two adjacent cells.

The existence of functional non-junctional channels was tested by cellular uptake of LY [Fig. 1(C)]. Dye uptake occurred in ~92% of PC as well as T/C-28a2 cells in monolayer culture, as quantified by LY incorporation over a 30-min period. No significant difference in LY uptake was observed.

To test if T/C-28a2 cells are electrically coupled to each other by voltage-dependent GJ, we conducted a dual voltage-clamp method and whole-cell/perforated patch recording to control the membrane potential of both cell pairs and to measure currents. The junctional current recordings showed the basic type of coupling for voltage-dependent behaviour pattern described for GJ [Fig. 1(D)]. Dye injection (fluorescent glucose, NBDG) in a single cell confirmed the functionality of GJ in T/C-28a2 cells. Dye transfer between cells in membrane contact was monitored for 12 min [Fig. 1(E)].

The GJ connectivity was further assessed through *in situ* electroporation and scrape loading assays [Fig. 2(A) and (B)]. Quantification of GJIC revealed extensive transfer (4–12 cells deep, score 4.66) of LY between PC [Fig. 2(A)]. In addition, inhibition of GJIC using 250 μ M of GAP27 for 1 h significantly reduced the transfer of LY between cells (1–3 cells deep, score 1.30). Lower levels of transference were detected when LY was electroporated into T/C-28a2 cells (0–2 cell deep, score 0.24) [Fig. 2(A)]. Scrape-loading LY transfer technique confirmed coupling in cultures of the T/C-28a2 cells. 250 μ M of GAP27 for 1 h significantly reduced GJIC between adjacent cells [Fig. 2(B)]. PC highly transferred LY to adjacent cells (7–12 cells deep). T/C-28a2 cells showed less coupling (1–4 cells deep) than PC [Fig. 2(B)].

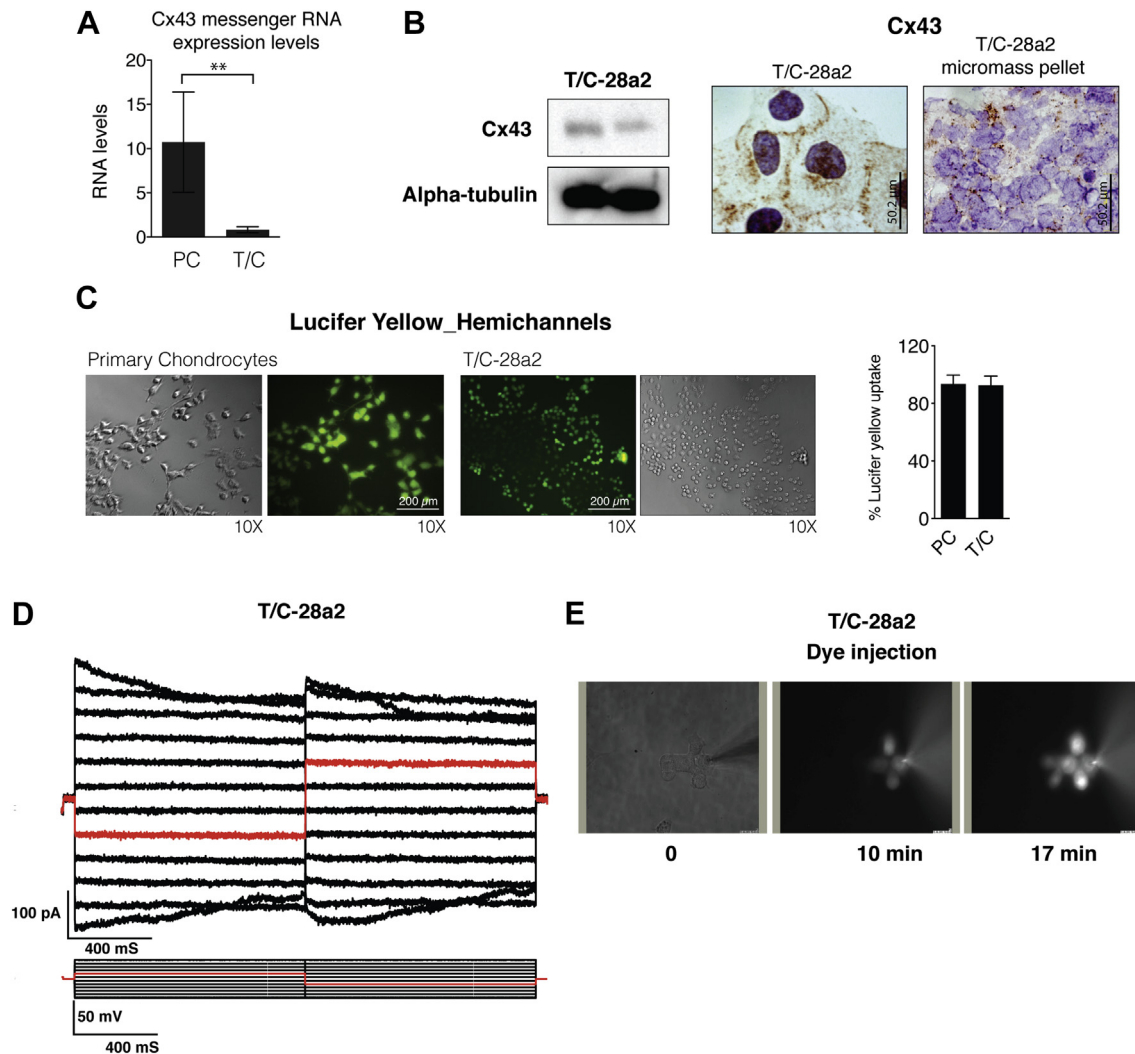


Fig. 1. T/C-28a2 cells contain functional Cx43 channels. (A) Expression analyses of Cx43 mRNA by real-time RT-PCR in PC isolated from the cartilage (PC) of adult donors and T/C-28a2 (T/C) cells. Data were normalized to HPRT1 levels. Data are represented as the mean \pm S.D. with $n = 5$. $^{**}P = 0.0043$; Mann–Whitney test. (B) Western blots of T/C-28a2 cells from two confluent monolayer cultures. α -tubulin was used as loading control. IHC using the monoclonal anti-Cx43 antibody and cells on monolayer (left) and pellet (right) cultures after 7 days of culture in micromass. (C) Both cell types showed LY uptake consistent with hemichannels behaviour. The percentage of LY positive cells was calculated from six fields of view from two independent experiments (mean \pm S.D.). (D) Voltage-gating properties of T/C-28a2 cells. (E) Dye (NBDG) flux in T/C-28a2 cell pairs. A pipette containing the dye was attached to the cell on the right in the whole cell configuration. Epifluorescent micrographs were taken at 0, 10, and 17 min after dye injection into the right-sided cell.

Western blotting of protein extracts from confluent cultures confirmed that T/C-28a2 cells produce significantly less Cx43 protein than PC [Fig. 2(C)]. In addition, higher levels of total c-Src kinase and active Tyr 416-phosphorylated c-Src were detected in T/C-28a2 cells. IHC assays using antibodies against total c-Src showed localization in the cytoplasm and in the membrane between adjacent cells [Fig. 2(D)]. However PC only showed cytoplasmic c-Src expression [Fig. 2(D)].

Discussion

There is strong evidence that chondrocyte cell–cell interactions play a critical role in chondrogenesis and in cartilage physiology. This cross-talk between articular chondrocytes includes direct contact-dependent gap junctional pathways^{1,4,9,10}. Although the cell communication involving GJ has been less studied, this system seems to play a pivotal role in chondrocyte metabolism and physiology in adult cartilage^{1,9} and alteration in Cx43 function may be associated with the development of OA⁴.

Only a few researchers have access to cartilage samples from human origin. It is also difficult to obtain a large number of cells

from cartilage derived from a single patient to perform cell culture experiments. Also, in PC from humans or animals, loss of chondrocyte phenotype occurs upon expansion in serial monolayer culture. The lack of a reproducible source of chondrocytes lead to the establishment of several chondrocyte lines derived from humans and animals. However some lines have limitations in the expression of type-II collagen. T/C-28a2, which was derived from primary cultures isolated from costal cartilage from 15-years-old female using the SV40 large T antigen, express genes encoding the chondrocyte-specific matrix molecules, including type-II collagen and proteoglycans¹¹. The present study shows that T/C-28a2 cells form functional connexin channels as demonstrated by dye uptake and electrophysiology experiments [Fig. 1(C) and (D)–(F)]. LY uptake by single cells is equal in both cell types [Fig. 1(C)]. Interestingly, the treatment of cells with the Cx43 mimetic peptide, GAP27, did not decrease LY uptake from extracellular medium by single cells [Fig. S1(A)]. It has been reported that chondrocytes express pannexins which form non-junctional channels that share similar membrane topology and similar electrical and chemical properties with hemichannels formed by connexins. Actually, PC and T/C-28a2 cells express high levels of pannexin 1 in comparison with the

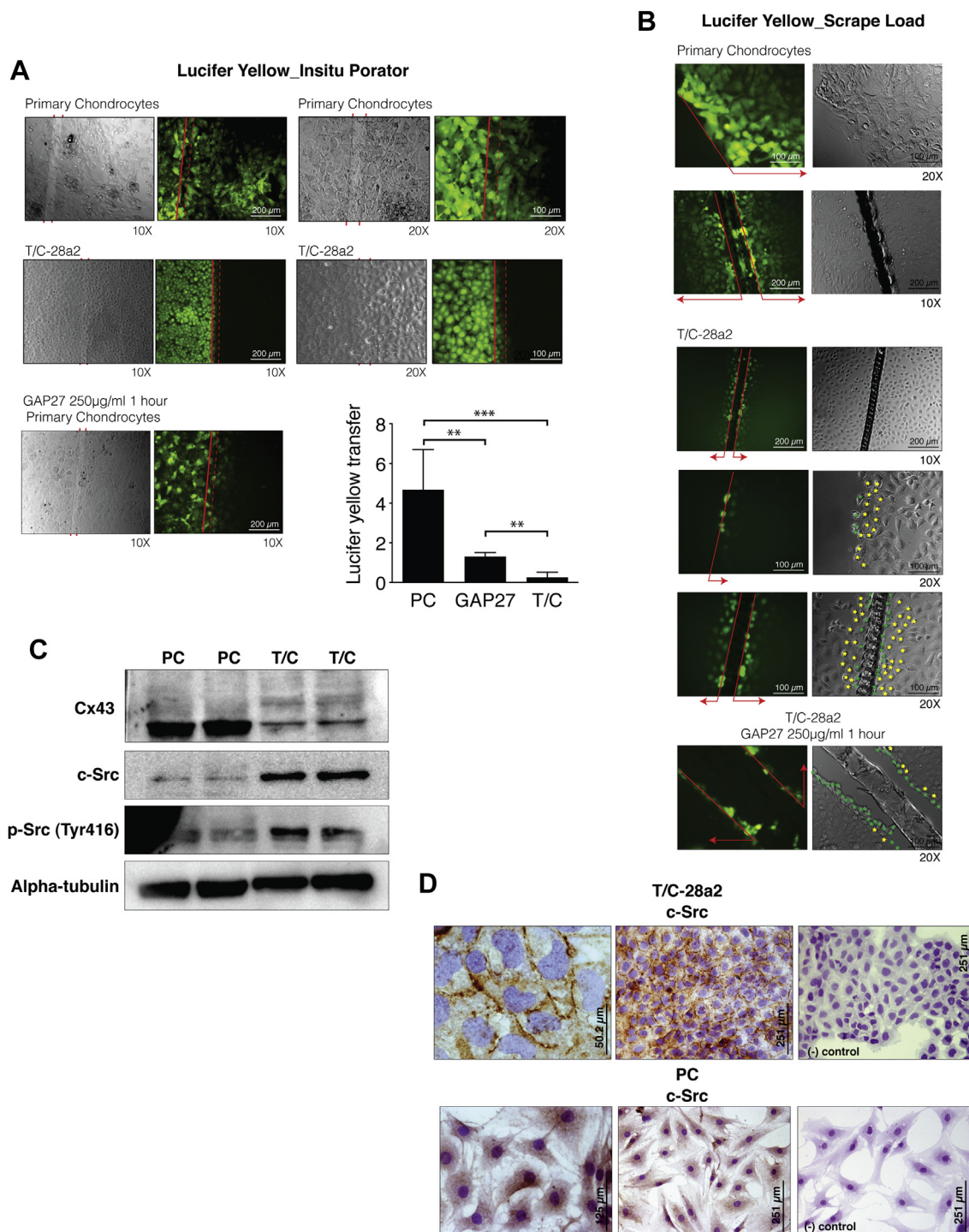


Fig. 2. GJIC between cells. (A) *In situ* electroporation on a partly conductive slide for the measurement of the intercellular junction transfer of LY. Cells were electroporated in the presence of 5 mg/ml of LY. After washing off the unincorporated LY, the cells were photographed under phase contrast or fluorescence illumination. The solid red lines define the conductive (on the left) and nonconductive side points (on the right). Original magnifications $\times 10$ and $\times 20$. The graph represents the number of contacted cells into which the dye was transferred per electroporated border cell (means \pm S.D.). $n = 6$ $^{**}P < 0.01$, $^{***}P = 0.0002$; Mann–Whitney test, untreated (PC) vs GAP27 and PC vs T/C-28a2. (B) Scrape load/dye transfer assay was performed to examine GJ activity. The distance of dye transfer from cutting edge (solid vertical red line and green stars) to the farthest cells with the dye uptake is represented by horizontal red arrows or yellow stars. (C) Western blot assays to detect the amount of Cx43 and c-Src present in PC and T/C cells. α -tubulin was used as loading control. (D) IHC of T/C-28a2 cells and PC using anti-c-Src antibody. The negative controls are shown on the right.

housekeeping gene HPRT1 [Fig. S1(B)]. Future studies will elucidate the different activities and functions of non-junctional channels formed by connexins and pannexins in articular chondrocytes.

Our results show that T/C-28a2 cells express lower levels of Cx43 mRNA and Cx43 protein than PC [Fig. 1(A) and Fig. 2(C)]. In accordance with these data, dye uptake and electrophysiology

experiments show lower level of GJIC in this cell line [Fig. 1(D) and Fig. 2(A), (B)]. Several potential regulators can affect to GJIC in T/C-28a2 cells. Among them, SV40-LT activates c-Src¹² and phosphorylation of Cx43-C-terminal tail by the c-Src tyrosine kinase are known to negatively regulate GJIC¹³. Western blotting and IHC show that T/C-28a2 cells contain relatively high levels of the active

form of c-Src that localizes in the membrane between adjacent cells [Fig. 2(C), (D)]. The detection of diffuse upper Cx43 immunoreactive bands by Western blot analysis [Fig. 2(C)] suggests post-transcriptional modifications of Cx43 in T/C-28a2 cells that are not present in the Cx43 from PC. In addition, the basic type of coupling between T/C-28a2 cells [Fig. 1(D)] could also suggest heteromeric coupling¹⁴. The changes in Cx43 expression or GJIC in PC and T/C-28a2 cells may be also a consequence of some alteration during primary culture. Chondrocytes in articular cartilage express lower levels of Cx43 and contain less Cx43 protein than chondrocytes in monolayer culture [Fig. S2(A, B)]. Furthermore, T/C-28a2 cells and chondrocytes in tissue contain higher levels of miRNA1-1 [Fig. S2(C)], which may down-regulate Cx43 expression¹⁵, but this may not occur in isolated PC in culture.

In conclusion, the T/C-28a2 cells, in addition to expressing specific markers of articular chondrocytes¹¹, appear to have the ability to form functional non-junctional and GJ channels between cells. The *in vitro* system described here may provide a useful model for the study of chondrocyte metabolism, physiology and mechanical properties and for the identification of the physiological and pharmacological agents capable of interfering with chondrocyte cell–cell or cell–matrix communication in articular cartilage.

Ethics approval

The study was conducted with the approval of the local ethics committee in Galicia, Spain.

Author contributions

MDM and FJB have full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity and the accuracy of the data presented.

Study conception and responsibility for the project planning: MDM and FJB.

Data acquisition/assembly/analysis/interpretation: RG-F, P C-F, PRB, MDM.

Writing of article: MDM.

Critical revision and approval of final submitted version of article: RG-F, P C-F, MBG, PRB, MDM and FBG.

Role of the funding source

This work was supported in part through funding from the Fondo Investigación Sanitaria, Madrid, Spain (CIBER – CB06/01/0040; PI12/00329; RETIC-RIER-RD12/0009/0018; Proteo-Red/ISCIII) (to FJB); Ministerio Ciencia e Innovación PLE2009-0144, FEDER (European Community) (to FJB); Sociedad Española de Reumatología (FER 2013) (to MDM) and ISCIII (PI13/00591) (to MDM); National Institutes of Health grants RO1 GM088180 (to PRB) and RO1-AG022021 (to MBG); a pre-doctoral fellowship from Xunta de Galicia to Raquel Gago-Fuentes. María D Mayán is an Isidro Parga Pondal researcher (Xunta de Galicia). The study sponsors had no role in the study design, data collection, data analysis, or writing of the manuscript and did not affect the decision to submit the manuscript for publication.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Lourdes Sanjurjo and Dolores Salinas Bujan for generously obtaining cartilage samples after surgery. Maria Jose Sanchez Dopico for isolating articular chondrocytes from cartilage for cell culture. Purificación Filgueira-Fernández and

Noa Goyanes for preparation of samples and IHC experiments. Dr Leda Raptis for helpful discussions and suggestions. Estefania Cives for administrative assistance. The authors would also like to thank Dr HZ Wang for the collection of electrophysiological data pertinent to this study.

Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2014.02.002>.

References

- Mayan MD, Gago-Fuentes R, Carpintero-Fernandez P, Fernandez-Puente P, Filgueira-Fernandez P, Goyanes N, *et al.* Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis. *Ann Rheum Dis* 2013 Nov 13, <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204244>.
- Murray DH, Bush PG, Brenkel IJ, Hall AC. Abnormal human chondrocyte morphology is related to increased levels of cell-associated IL-1 β and disruption to pericellular collagen type VI. *J Orthop Res* 2010;28:1507–14.
- Chi SS, Rattner JB, Matyas JR. Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage. *J Anat* 2004;205:363–70.
- Mayan MD, Carpintero-Fernandez P, Gago-Fuentes R, Martinez-de-Illarduya O, Wang HZ, Valiunas V, *et al.* Human articular chondrocytes express multiple gap junction proteins: differential expression of connexins in normal and osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol* 2013;182:1337–46.
- Knight MM, McGlashan SR, Garcia M, Jensen CG, Poole CA. Articular chondrocytes express connexin 43 hemichannels and P2 receptors – a putative mechanoreceptor complex involving the primary cilium? *J Anat* 2009;214:275–83.
- Garcia M, Knight MM. Cyclic loading opens hemichannels to release ATP as part of a chondrocyte mechanotransduction pathway. *J Orthop Res* 2010;28:510–5.
- Lin Z, Willers C, Xu J, Zheng MH. The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue Eng* 2006;12:1971–84.
- Raptis L, Vultur A, Brownell HL, Tomai E, Anagnostopoulou A, Arulanandam R, *et al.* Electroporation of adherent cells in situ for the study of signal transduction and gap junctional communication. *Methods Mol Biol* 2008;423:173–89.
- Stains JP, Civitelli R. Gap junctions in skeletal development and function. *Biochim Biophys Acta* 2005;1719:69–81.
- Zhang W, Green C, Stott NS. Bone morphogenetic protein-2 modulation of chondrogenic differentiation in vitro involves gap junction-mediated intercellular communication. *J Cell Physiol* 2002;193:233–43.
- Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, *et al.* Interleukin-1 β -modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest* 1994;94:2307–16.
- Arulanandam R, Geletu M, Raptis L. The simian virus 40 large tumor antigen activates cSrc and requires cSrc for full neoplastic transformation. *Anticancer Res* 2010;30:47–53.
- Geletu M, Trotman-Grant A, Raptis L. Mind the gap; regulation of gap junctional, intercellular communication by the SRC oncogene product and its effectors. *Anticancer Res* 2012;32:4245–50.
- Brink PR, Cronin K, Banach K, Peterson E, Westphale EM, Seul KH, *et al.* Evidence for heteromeric gap junction channels formed from rat connexin43 and human connexin37. *Am J Physiol* 1997;273:C1386–96.
- Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, *et al.* The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* 2007;13:486–91.

EXTENDED REPORT

Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis

Maria D Mayan,¹ Raquel Gago-Fuentes,¹ Paula Carpintero-Fernandez,¹ Patricia Fernandez-Puente,² Purificacion Filgueira-Fernandez,³ Noa Goyanes,³ Virginijus Valiunas,⁴ Peter R Brink,⁴ Gary S Goldberg,⁵ Francisco J Blanco^{1,2,3}

Handling editor Tore K Kvien

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204244>).

¹Rheumatology Division, Cartilage Biology Research Group, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, A Coruña, Spain

²Rheumatology Division, ProteoRed/ISCIII, Proteomics Group, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, A Coruña, Spain

³Rheumatology Division, CIBER-BBN/ISCIII, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, A Coruña, Spain

⁴Department of Physiology and Biophysics, State University of New York, Stony Brook, New York, USA

⁵Department of Molecular Biology, Medical Center Drive, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Stratford, New Jersey, USA

Correspondence to

Dr Francisco J Blanco, Rheumatology Division, CIBER-BBN/ISCIII, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, Xubias de Arriba 84, A Coruña 15006, Spain; fblagar@sergas.es

MDM, RG-F and PC-F contributed equally.

Received 6 July 2013

Revised 12 September 2013

Accepted 26 October 2013

ABSTRACT

Objective This study investigated whether chondrocytes within the cartilage matrix have the capacity to communicate through intercellular connections mediated by voltage-gated gap junction (GJ) channels.

Methods Frozen cartilage samples were used for immunofluorescence and immunohistochemistry assays. Samples were embedded in cacodylate buffer before dehydration for scanning electron microscopy. Co-immunoprecipitation experiments and mass spectrometry (MS) were performed to identify proteins that interact with the C-terminal end of Cx43. GJ communication was studied through in situ electroporation, electrophysiology and dye injection experiments. A transwell layered culture system and MS were used to identify and quantify transferred amino acids.

Results Microscopic images revealed the presence of multiple cellular projections connecting chondrocytes within the matrix. These projections were between 5 and 150 µm in length. MS data analysis indicated that the C-terminus of Cx43 interacts with several cytoskeletal proteins implicated in Cx trafficking and GJ assembly, including α -tubulin and β -tubulin, actin, and vinculin. Electrophysiology experiments demonstrated that 12-mer oligonucleotides could be transferred between chondrocytes within 12 min after injection. Glucose was homogeneously distributed within 22 and 35 min. No transfer was detected when glucose was electroporated into A549 cells, which have no GJs. Transwell layered culture systems coupled with MS analysis revealed connexins can mediate the transfer of L-lysine and L-arginine between chondrocytes.

Conclusions This study reveals that intercellular connections between chondrocytes contain GJs that play a key role in cell-cell communication and a metabolic function by exchange of nutrients including glucose and essential amino acids. A three-dimensional cellular network mediated through GJs might mediate metabolic and physiological homeostasis to maintain cartilage tissue.

INTRODUCTION

Articular cartilage covers the ends of bones to facilitate the painless, low-friction movement of synovial joints. This tissue contains extracellular matrix (ECM) that is primarily composed of type II collagen and proteoglycans. Chondrocytes are highly specialised cells embedded in the ECM that provide cartilage with its remarkable mechanical properties. The cells occupy less than 10% of the total volume of articular cartilage but are responsible for the formation, maintenance and repair of

the tissue throughout adult life.¹ Unlike bone and other connective tissues, adult cartilage is an avascular, lymphatic tissue that is not innervated.^{2,3}

Chondrocytes are isolated in small cavities known as lacunae. This characteristic has given rise to the notion that chondrocytes are not directly connected with each other and that they communicate with other chondrocytes primarily through the diffusion of substances in the matrix. However, proper cell-to-cell communication is essential for the organisation of a timely and uniform response to physical or biological stimuli or cell damage or simply to maintain tissue homeostasis. The lack of blood vessels and lymphatics and the relative isolation of the cells have been proposed to underlie the poor regenerative capacity of cartilage. This, however, is most likely not the case for articular cartilage, as ageing reduces the cell density and cartilage thickness, which allows the tissue to maintain its structure and function.^{4,5} However, the progressive degeneration of the articular cartilage matrix leads to osteoarthritis (OA), which is one of the most common causes of pain and disability in the Western world. OA is a degenerative joint disease characterised by the degeneration and subsequent loss of articular cartilage structure and function.^{6–9}

We have recently shown that human articular chondrocytes express integral membrane proteins known as connexins (Cx).¹⁰ Cxs form hemichannels that in turn form gap junctions (GJs) to directly connect the cytoplasm of two adjacent cells. GJs are responsible for the chemical and electrical coupling that occurs in neuronal synapses and the coordinated depolarisation of cardiac muscle.¹¹ These channels enable the exchange of small hydrophilic molecules, including second messengers such as inositol 1,4,5-triphosphate (IP3), cAMP, glutamate and ATP,^{12–17} which serve a variety of functions. We have demonstrated that primary chondrocytes from human adults retain the capacity to communicate through voltage-gated GJ channels.¹⁰ The presence of functional GJs, together with other previously unpublished results obtained by our group using optical microscopy, led us to further investigate the morphology of articular chondrocytes in tissue.

MATERIALS AND METHODS

Cartilage collection and processing

Human knee and femoral head articular cartilage samples were obtained from adult donors after joint surgery after informed consent and Institutional

To cite: Mayan MD, Gago-Fuentes R, Carpintero-Fernandez P, et al. *Ann Rheum Dis* Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/annrheumdis-2013-204244

Basic and translational research

Ethics Committee approval. Fresh cartilage explants from *Sus scrofa* were generously donated by the veterinary area of the INIBIC-Hospital Universitario A Coruña. In situ cartilage samples were frozen immediately in Cryomold Standard using Tissue-Tek O.C.T. compound and isopentane in liquid nitrogen and stored at -80°C . For the isolation and culture of primary chondrocytes, the fresh cartilage surface was rinsed with saline. A scalpel was used to cut parallel vertical sections, which were subsequently incubated with trypsin-EDTA solution (0.5 mg/mL) for 10 min at 37°C . After removing the trypsin solution, the cartilage slides were treated for 16–18 h with 2 mg/mL clostridial collagenase type IV (Gibco BRL, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), supplemented with 5% foetal calf serum (FCS; Gibco, Invitrogen) to release the cartilage cells. The cells were then seeded onto 25 cm² (250 000 cells), 75 cm² (2 million cells) or 162 cm² (3 million cells) flasks and incubated at 37°C in 5% CO₂ and air in DMEM supplemented with 100 µg/mL Primocin (Invivo Gen Primocin) and 15% FCS.¹⁰ The cells were grown to ~80–90% confluence. Chondrocytes were used for experiments during the third or fourth week of primary culture (see online supplementary figure S1).

Tissue processing and immunohistochemistry (IHC) assays

Cartilage sections were serially sectioned (4 µm) at -20°C in a Cryostat (Leica CM1510). The tissue sections were fixed with acetone for 10 min at 4°C , dried at room temperature (RT) and washed for 10 min with PBST (PBS with 0.1% Tween 20, pH 7.6). Before staining, endogenous peroxidase activity was inhibited by incubation with H₂O₂ and methanol for 10 min. The cells were then washed once with PBST, and the primary antibody was applied for 1 h at RT. After three washes with PBST for 10 min each, the sections were incubated with a peroxidase-labelled polymer conjugated to goat anti-mouse/rabbit Ig (Dako, Denmark) for 1 h. After three washes with PBST, peroxidase activity was developed using a freshly prepared substrate chromogen solution containing 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride and H₂O₂ (Dako, Denmark). The sections were washed in distilled water, counterstained with Gill's haematoxylin, gradually dehydrated with graded alcohol and mounted in xylene with Depex (Serva, Germany). The cultured cells were seeded (25 000 or 250 000 cells) onto chamber slides and fixed with acetone for 10 min at 4°C , dried at RT and washed for 10 min with PBST before following the procedure described above. Negative controls (omitting the primary antibody) were performed to test the specificity of each antibody. Anti-Cx43 (610062) was supplied from BD Transduction Laboratories. Anti-Collagen II (MAB1330) was obtained from Millipore. Anti-Sox9 (ab76997) was purchased from Abcam and anti-CD31 (M0823) from Dako. Tissue sections were also counterstained with Gill's haematoxylin or with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The slides were imaged using an Olympus BX61 microscope and a DP71 digital camera (Olympus). Image calibration was performed with AnalySIS^D V.5.0 software (Olympus Biosystems, Hamburg, Germany).

Scanning electron microscopy

Tissues frozen in the Tissue-Tek O.C.T. compound and stored at -80°C were cut into pieces with a scalpel, defrosted at RT by immersion in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.4, dehydrated in a graded series of ethanol, dried using the critical point method and coated with gold using a sputter procedure. Images were obtained at RT using a Jeol JEM 6400 Scanning Electron Microscope at 20 kV and Inca Energy V.200 software.

Co-immunoprecipitation

Immunoprecipitation (IP) experiments were performed with primary chondrocytes from human adults. Because lysis and solubilisation can disrupt protein–protein or protein–membrane interactions, to identify Cx43-interacting partners, the cells were cross-linked using a low concentration of formaldehyde (1%) for 15 min at RT.¹⁸ The cross-linking reaction was quenched for 10 min by adding 1 M glycine to a final concentration of 0.125 M. After cross-linking, the cells were collected, washed with PBS and frozen at -80°C . The cells were then resuspended in 1000 µL of IP lysis buffer containing protease inhibitors (Sigma) and 1 mM PMSF (50 mM Tris–HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, pH 8, NP-40 0.5% vol/vol, 1.0% vol/vol Triton-X and 150 mM NaCl). The lysates were precleared by incubation with 50 µL of protein G sepharose (50% slurry). The anti-CTD-Cx43 antibody (SC-20; Santa Cruz Biotechnology) was then added to the precleared lysates, followed by protein G sepharose beads (50 µL of 50% slurry), and the samples were incubated overnight at 4°C . To discard non-specific-binding proteins, Co-IP experiments were also performed in parallel without antibodies. The beads were washed four times with IP buffer. The bead pellets were suspended in loading buffer (10% SDS, 0.2 M Tris, pH 6.8, 50% glycerol, 0.1% (w/v) bromophenol blue (5×) containing 1.42 M 2-mercaptoethanol) and boiled for 10 min. The supernatants were collected and stored at -80°C . Silver stain analysis of the IPs and western blots was used to determine the specificity of the interactions. For SDS-PAGE gel electrophoresis, 5 µL of the denatured immunoprecipitated proteins were loaded and separated on 10% polyacrylamide gels. The gels were electroblotted onto polyvinylidene fluoride membranes (Millipore Co, Bedford, Massachusetts, USA). The membranes were blocked with 5% milk in PBS containing 0.1% Tween-20 (Sigma). After probing with antibodies, the membranes were developed using an ECL Western Blotting Detection reagent from GE Healthcare.

Identification of proteins using SDS-PAGE and nanoLC MALDI-TOF/TOF

Immunoprecipitated proteins were loaded and separated by SDS-PAGE on 10% acrylamide gels in a Protean mini-gel system (Bio-Rad, Hercules, California, USA). The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue G25, and the resulting lanes were size-fractionated into three sections that were subsequently processed independently and subjected to in-gel digestion following a standard procedure.¹⁹ The peptide fractions were separated using reverse-phase chromatography in a nanoLC system (Tempo, Eksigent, Dublin, California, USA) and deposited onto a MALDI plate using an automatic spotter (SunCollect, Sunchrome, Friedrichsdorf, Germany). The mass spectrometry (MS) runs for each chromatogram were acquired and analysed in a MALDI-TOF/TOF instrument (4800 ABSciex, Framingham, Massachusetts, USA). The identification of peptides and proteins and the relative quantification of their abundances were performed using the Protein Pilot software V.3.0 (Applied Biosystems) with a Paragon Algorithm. The MS/MS data were searched against the UniProt/Swiss-Prot database of protein sequences (UniProt Swiss-Prot 2010_2012) using the following parameters: cysteine alkylation with IAA, urea denaturation, one missed cleavage allowed in trypsin digestion and focus on biological modifications. Only proteins with a threshold >95% confidence (>1.3 Unused Score) were considered for protein identification.

Image recording and data analysis

To determine the intercellular permeability of glucose and oligonucleotides, we employed previously published methods.^{20–21}

Primary human chondrocytes were placed on an inverted microscope for probe injection. Micropipettes were pulled from capillary glass with a vertical pipette puller and backfilled with either 1 mM glucose or 0.5 mM of oligonucleotide in pipette solution as described previously.¹⁵ A 12-mer morpholino was used as previously reported.¹⁵ Both probes were injected into one cell of a monolayer of primary chondrocytes obtained from human adults, as previously reported.²⁰ The data recording and analysis were performed as previously described.^{17 20}

Electroporation in situ

The quantification of GJ intercellular transference was performed as previously described.^{22 23} Briefly, the system (InSitu Porator, Cell Projects Ltd) was used to introduce tracer dyes and other molecules into cells growing on a transparent electrode in a non-traumatic manner (cells located to the right of the electrode; see figure 5B), and GJ-based transfers are detected by diffusion of the dye to adjacent, non-electroporated cells (cells located to the left of the electrode). The cells were grown on glass slides, half of which was coated with electrically conductive, optically transparent, indium-tin oxide. A total of 400 µL of the fluorescent glucose tracer, 2-NBDG (1 mg/mL in HBSS without calcium), was applied to the cells and introduced through an electrical pulse (mild setting, 20 V). The electroporation solution was then aspirated, and the cells were incubated at 37°C for 4 min in DMEM supplemented with 10% dialysed FBS. The cells were then fixed with 4% formaldehyde in PBS for 2 min at RT. The migration of the dye through GJs to non-electroporated cells growing on the non-conductive area of the slide was observed under fluorescence illumination using an inverted fluorescence microscope (Inverted Research Microscope Eclipse Ti, Nikon) with imaging software (NIS-Element AR, V3.0).

Metabolic capture assay

A layer culture system was used to study the transference of amino acids as previously described^{14 24–27} with some modifications. Briefly, ‘donor’ primary human chondrocytes were cultured in SILAC DMEM containing 10% dialysed FBS and supplemented with 73 mg/mL of [¹³C₆]-L-lysine, 28 mg/mL of [¹³C₆, ¹⁵N₄]-L-arginine and 10× L-glutamine, designated ‘labelled’ medium. The same number of primary chondrocyte ‘receiver’ cells was cultured in non-labelled SILAC DMEM containing 73 mg/mL L-lysine and 28 mg/mL L-arginine, L-glutamine and 10% dialysed FBS. The cells were expanded in labelled or non-labelled medium for six doublings. The receivers were plated onto inverted inserts containing porous membranes suitable for cell culture (12 mm Transwell with a 3.0 µm Pore, Corning) or into each well of a six-well cluster plate as ‘control receivers’. After adhering to the membranes, the inserts containing receiver cells were turned right-side-up and plated into six-well plates. The donors and receivers are able to make contacts through cellular projections and to form GJs through the pores in the membrane, which measure 3 µm in diameter and are small enough to block cells greater than 10 µm in diameter from migrating to the other side of the membrane (cells incubated on the top of the membrane overnight did not migrate through the membrane) within the time frame of the assay (4 h after the donors were plated above the receivers). The cells were scraped with a sterile rubber policeman (Sigma-Aldrich), collected in PBS in 1.5 mL tubes (Eppendorf) and stored at –80°C. Each cell pellet was lysed in 112.5 µL of lysis buffer (10 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0, 1% NP-40, 1 mM PMSF) for 20 min at 4°C, diluted with 634.5 µL of dilution buffer (10 mM Tris, pH 8.0, and 10 mM EDTA, pH 8.0), sequentially

filtered through 50 and 3 kDa Centricon filters (KDa, Amicon) and frozen at –80°C. The fractions corresponding to molecules less than 3 kDa were dried in a SpeedVac (Savant SPD 121p, Thermo). Identification and quantification of free amino acids were performed using ESI⁺/LC/MS-Orbitrap. Prior to the LC analysis, the amino acids were derivatised using the EZ:faastTM kit according to the manufacturer’s protocol (EZ:faast LC-MS for the free physiological amino acid kit; Phenomenex, USA). Calculations were performed using the data analysis portion of the software that controls the analytical system (Xcalibur V2.0.7, Thermo Scientific, USA).

Statistical analysis

Data were analysed using GraphPad Prism software (V5.00). Significant differences between sample groups were assessed using Student t test and Mann–Whitney test. Significant differences are represented as *p<0.05 and **p<0.01. Data are presented as mean±SEM.

RESULTS

Articular chondrocytes have long, thin cytoplasmic arms extending from the cell body to connect with distant lacunae

Gill’s haematoxylin-stained histological sections of cartilage from *S. scrofa* revealed the presence of multiple projections that cross the matrix and specifically join cells located in different lacunae (see figure 1A and online supplementary figure S2). While these projections were primarily located in the superficial to middle zones, they were also observed in the deepest zones of the cartilage. IHC analysis of cartilage from human adults, performed with anti-Col2A and anti-Sox9 antibodies, suggested the presence of long cellular projections (figure 1B), ranging from 5 to 150 µm in length, between distant lacunae (see online supplementary figure S3). Cells with projections showed positive signals for both antibodies (figure 1B). A more detailed examination by confocal microscopy showed further evidence for the presence of long cytoplasmic extensions that project from the cell body and span several cell micrometres within the matrix to reach a distant lacuna (figure 1C).

The structure of the cartilage does not favour the identification of cell elements, projections or other cellular details that cross the dense ECM by microscopy techniques. Cellular extensions between cells in the same plane of sectioning were only detected in less than 1% of the analysed samples. The results obtained in figure 1A were obtained using young cartilage from *S. scrofa*, which contains higher number of chondrocytes than cartilage from human adults.

Scanning electron microscopy (SEM) of *S. scrofa* and human cartilage samples confirmed that the projections observed by optical microscopy (figure 1) are indeed cytoplasmic extensions of the cell (figure 2). Chondrocytes within cartilage contain at least two long cytoplasmic extensions per chondrocyte that spread thinly (~200 nm in width) along the ECM and were found to physically connect cells located in different lacunae (figure 2).

Cx43 is located along chondrocyte membranes, including cellular projections

As predicted, IHC analysis of primary human chondrocytes revealed high levels of Cx43 between the cytoplasm of two adjacent cells, confirming the presence of GJ channels between the contacting cells (figure 3A, blue arrows). Interestingly, Cx43 was also detected along the thinner extensions of cultured human chondrocytes (figure 3B, red arrows). In tissue samples,

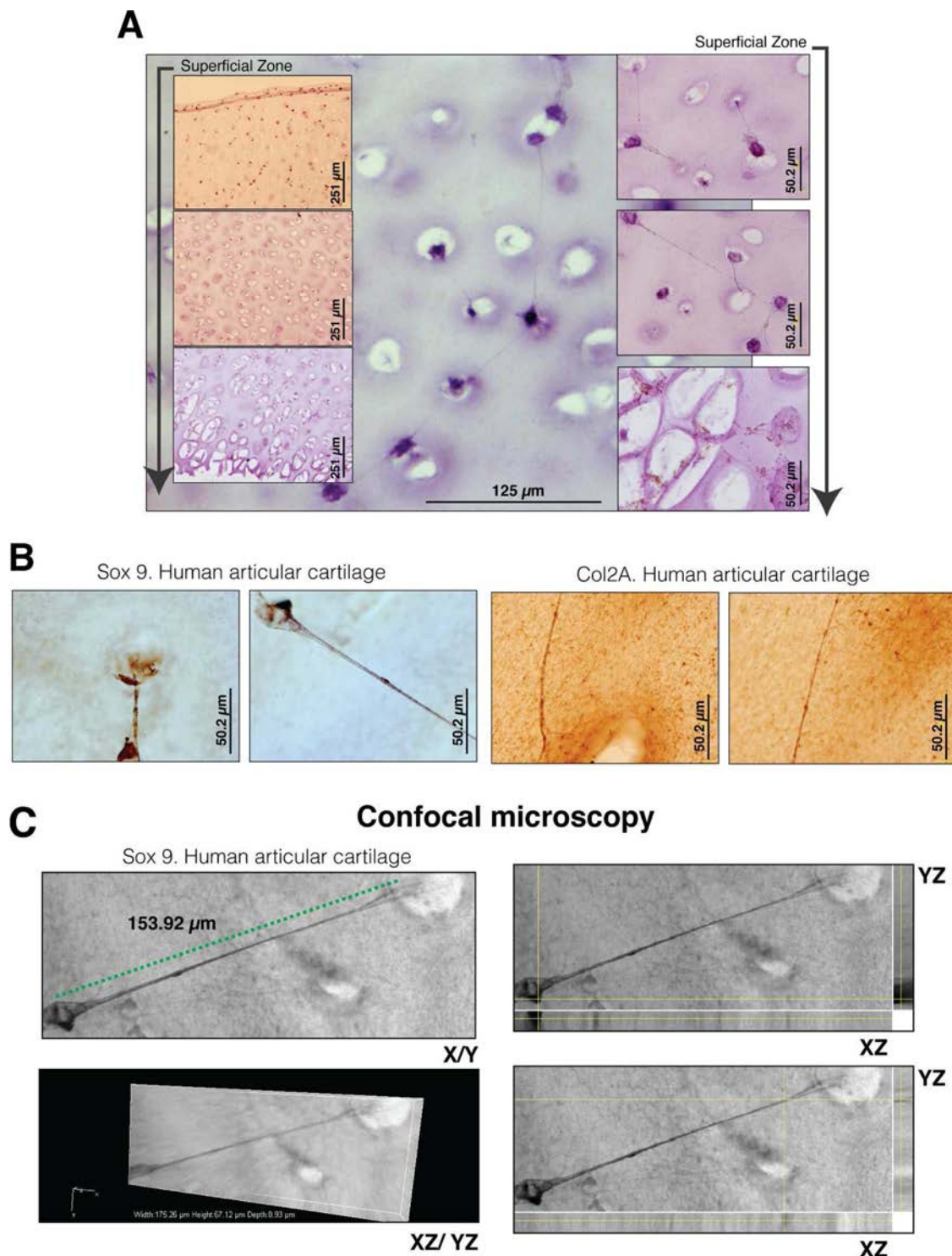


Figure 1 Optical images demonstrate the presence of cellular connections between chondrocytes in articular cartilage. (A) Immunohistochemistry (IHC) coupled with Gill's haematoxylin counterstaining using articular cartilage from *Sus scrofa* (3 months old) and an antibody for the endothelial/haematopoietic marker CD31 confirmed that the cells found in individual lacunae and containing cellular connections correspond to chondrocytes (see online supplementary figure S2). Cartilage sections were analysed from the superficial zone, located next to the synovial fluid, to the deepest region next to the subchondral bone. (B) IHC analysis of cryosections of cartilage obtained from human adults stained with a monoclonal anti-Col2A antibody or an anti-Sox9 antibody. Note that no Gill's haematoxylin counterstaining was performed before IHC experiments. (C) Confocal microscopy confirmed that cell projections and cell bodies are embedded in the extracellular matrix and that cell projections and cell bodies coincide in the same point of plane. Transmitted light images were obtained using a Nikon Ti Eclipse Confocal Microscope and the Confocal A1R Nikon imaging system. The analysis was performed using NIS Elements AR V.3.2 imaging software. For 3D imaging, sequence of Z-stack images (each 0.53 μ m of depth) were captured in different Z-axis (depth of focus). The images are shown in X/Y axis and XZ/YZ (Z-stack images) axis. The green dashed line shows the cell body and cell projection detected in the same plane of section.

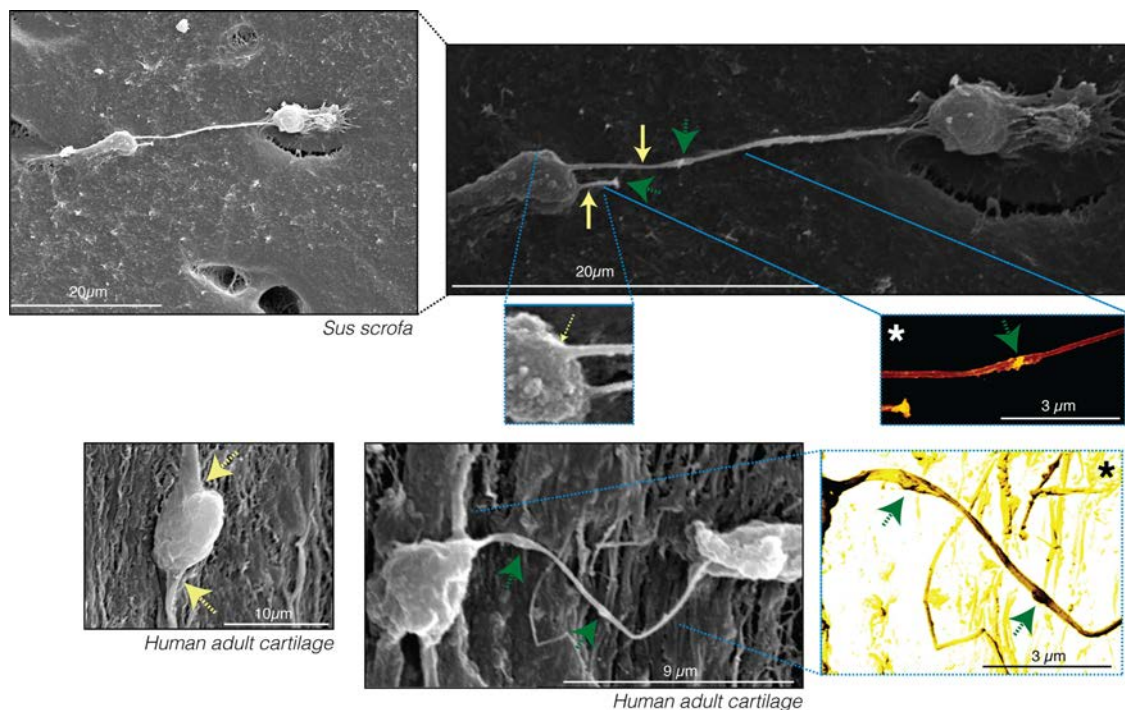


Figure 2 Scanning electron microscopy images validate the presence of long, thin cytoplasmic arms extending from the cell body. Long cytoplasmic arms were observed in chondrocytes from *Sus scrofa* and human adults. The yellow arrows indicate cytoplasmic projections. Original images show different characteristic intensities or grey levels. The cells appear bright grey, whereas the matrix components are darker grey. The asterisk indicates images that were processed to improve the contrast and provide colour to the original greyscale image. Homogeneous colourisation was performed for the entire image without selecting any areas to ensure that colours fairly represent the differences in the intensity of the original images. The green arrows indicate the presence of vesicles or other components within the projection.

Cx43-positive spots were distributed throughout the cell, particularly at the edges of the lacuna (figure 3C). We also detected positive staining within the matrix outside the lacuna (figure 3C, red arrows), suggesting the presence of GJs in the cellular projections.

Interactions between Cx43 and cytoskeletal proteins implicated in Cx trafficking were investigated through co-immunoprecipitation using cultured human chondrocytes and an antibody that specifically recognises the C-terminal end of Cx43, followed by nano-LC-MS/MS analysis. The MS data analysis indicated that the C-terminal tail of Cx43 interacts with several cytoskeletal proteins, including α -tubulin and β -tubulin, actin, vimentin and vinculin (figure 3D and table 1). These results are consistent with chondrocytes forming GJs and communicating through cellular extensions.

Neighbouring chondrocytes exchange solutes, including oligonucleotides

An analysis of fluorescent DAPI counterstaining of cartilage sections from *S scrofa* revealed positive fluorescence in cellular projections (figure 4A), suggesting functional coupling among tissue chondrocytes. The images shown in figure 4A were overexposed; however, DAPI fluorescence was specifically observed in cellular projections, not in the matrix, indicating that these fluorescent signals were not due to overexposure of the image.

To confirm whether adult human chondrocytes can transfer siRNA-sized oligonucleotides through GJs, as suggested by the images obtained in figure 4A, fluorescently labelled oligonucleotides (morpholinos), 12 nucleotides in length (12-mer oligo), were synthesised and introduced into one cell of a pair using a patch pipette (figure 4B). The results demonstrated that the

12-mer oligo was transferred between primary chondrocytes within 12 min after injection (figure 4B).

Direct transfer of glucose and amino acids between neighbouring chondrocytes

The capacity of chondrocytes to transfer glucose through GJs was studied by loading glucose into individual human chondrocytes and subsequently confirmed through in situ electroporation (figure 5). A solution containing a fluorescent glucose tracer (2-NBDG) was introduced into one cell of a pair (donor cell) through a patch pipette (figure 5A). Inter-cellular transfer of glucose was observed between adjacent chondrocytes, resulting in homogeneous distribution of the label within 22–35 min (figure 5A).

In situ electroporation on a partly conductive slide confirmed that the direct transfer of glucose between contacting cells occurred through GJs (figure 5B). Primary chondrocytes displayed a gradient of fluorescently labelled glucose following electroporation in the in situ chamber (figure 5B). Quantification of intercellular communication revealed extensive transfer (8–20 cells deep, score 7.39) of glucose between cells (figure 5C). The graph shows the number (score) of contacted cells into which the dye was transferred per electroporated border cell. No transference was detected when glucose was electroporated into A549 cells, which have no GJs (0–1 cell deep, score 0.16). In addition, inhibition of GJ intercellular communication using the Cx43 mimetic peptide blocker GAP27 (250 μ M for 1 h) significantly reduced the transfer of glucose between chondrocytes (1–4 cells deep, score 1.61) (figure 5B, C).

To study the transfer of endogenous amino acids through GJs, we employed stable isotope labelling of amino acids in cell culture

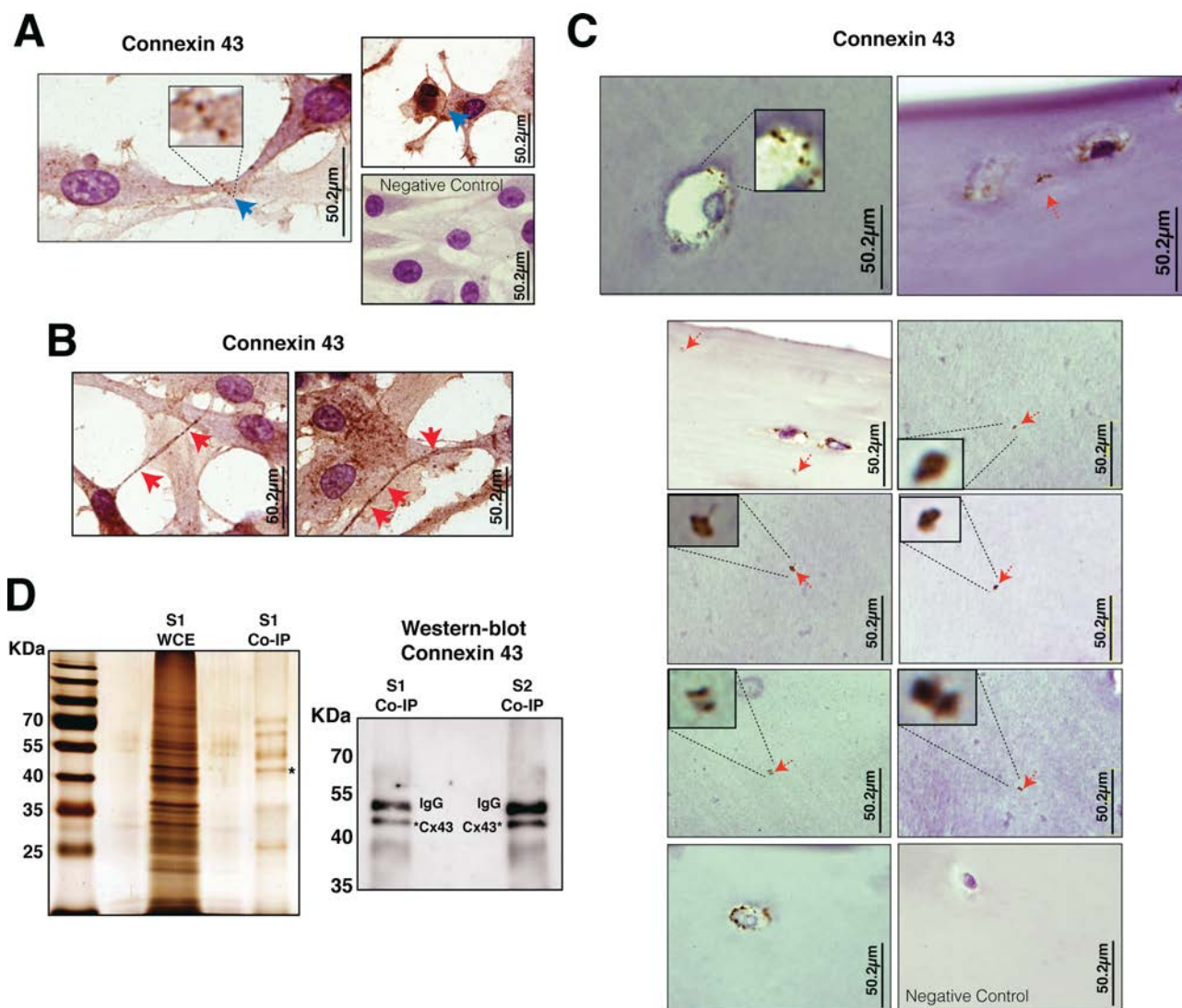


Figure 3 Interaction of Cx43 with microtubules and actin filaments. (A) Immunohistochemistry (IHC) with an anti-Cx43 antibody coupled with Gill's haematoxylin counterstaining on primary human chondrocytes. Negative control is shown on the right. The nucleus (dark purple) can be differentiated from the cytoplasm (clear purple). Cx43 was primarily localised in the cytoplasm, at the edge of the cytoplasm (membrane localisation), between the cytoplasm of two adjacent cells (blue arrows) and (B) in the thin extensions (red arrows). (C) IHC with anti-Cx43 on articular cartilage from adult humans. Positive signals for Cx43 were enriched on the cell edges (first and last image) and in the middle of the matrix (red arrows), suggesting the presence of thin extensions in the latter. (D) Immunoprecipitation (IP) experiments combined with the identification of interacting proteins through mass spectrometry analysis. Whole cell extract (WCE) and proteins immunoprecipitated with an anti-CTD-Cx43 antibody were analysed by silver staining and western blotting. Remnants of the IgG-heavy chain (53 kDa) from the antibody used for IP are visible but distinguishable from the Cx43 signal (43 kDa). The proteins listed in table 1 were identified from ten IP experiments using primary chondrocytes from ten different donors.

(SILAC) in a layered culture system containing a porous membrane (figure 5D). IHC analysis of transwell membranes containing human articular chondrocytes stained with an anti-Cx43 antibody revealed the presence of cellular projections through the pores 4 h after the cells were plated (figure 5D). We included a layer of 'control receiver' cells plated 1 mm below the membrane to prevent direct cell contact or GJ formation with donors (figure 5D). MS analysis revealed the presence of L-lysine ($^{13}\text{C}_6$) and L-arginine ($^{13}\text{C}_6$ - $^{15}\text{N}_4$) in the receivers but not the controls, confirming the intercellular transfer of these amino acids (figure 5D).

DISCUSSION

In the present study, we demonstrate for the first time that chondrocytes in articular cartilage are physically connected through a cellular network capable of mediating metabolic coupling and

the transfer of small siRNA-sized or miRNA-sized RNA molecules, as well as glucose and essential amino acids. SEM analysis revealed that chondrocytes embedded in the cartilage matrix contain at least two long cytoplasmic arms that spread along the matrix to reach a distant cell located in a different lacuna (figure 2). Long thin extensions of the cytoplasm were also observed in cultured chondrocytes (figure 3A,B).

A number of studies have elucidated structural characteristics of articular chondrocytes. The presence of small cellular extensions was observed in the superficial layer of cartilage from one patient with OA.²⁸ In addition, cell processes 8 μm in length were observed in the middle zone²⁹ and identified by others as potential interconnecting tracks running through the ECM.³⁰ Although some reports suggested the presence of cytoplasmic projections or cell remnants in the superficial and middle zones,

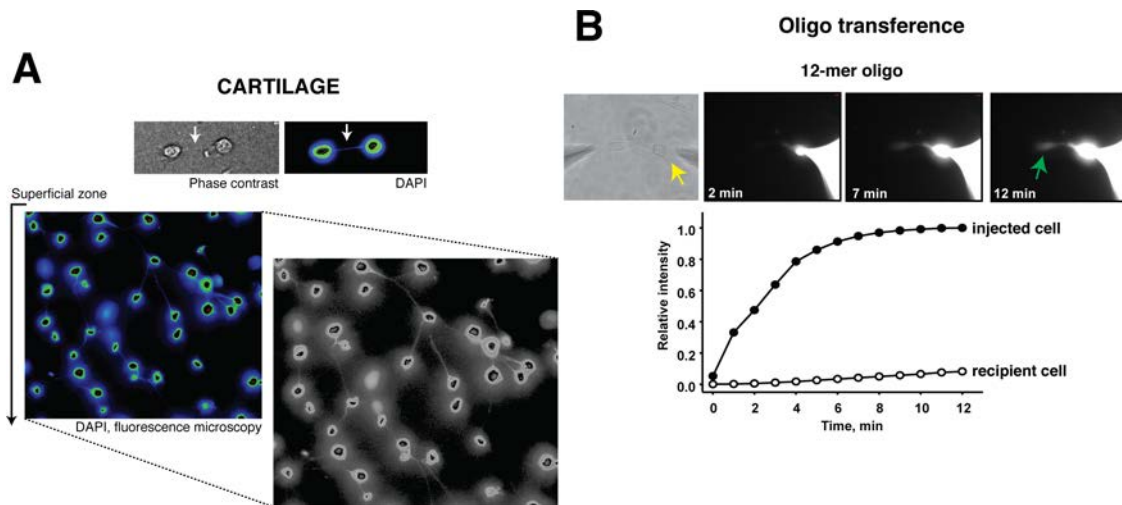


Figure 4 Direct exchange of small oligonucleotides. (A) 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining of cartilage from *Sus scrofa*. Optical and fluorescent images reveal fluorescent cellular projections. The images were overexposed. Original and processed images are shown as indicated. (B) Flux of a 12-mer oligo in human chondrocyte cell pairs. Upper panel: a pipette containing the oligo was attached to the cell on the right in a whole-cell configuration. Epifluorescent micrographs were captured at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 min after dye injection into the cell on the right. The results show progressively increased fluorescence intensity in the recipient cell. Lower panel: plots of fluorescence intensity versus time for the injected cell (filled circles) and the recipient cell (empty circles). The data are presented as mean \pm SEM.

no previous studies have directly observed intercellular connections between chondrocytes in the cartilage matrix.

The existence of intercellular connections relies on the establishment of cell-cell contacts. Recently reported results from our group revealed that cell-to-cell communication between adult human chondrocytes can occur through GJ channels.¹⁰ In fact, it was previously shown that animal chondrocytes express the GJ protein Cx43 and form functional GJ channels in dense monolayer and micromass culture.^{31–38} However, these reports fail to explain how highly specialised cells such as articular chondrocytes that exist as individual cells that are not in physical contact with one another express Cx43 and form GJ channels. It has been assumed that GJs only occur in clusters of chondrocytes. Results presented herein demonstrate that distant chondrocytes in mature articular cartilage are in physical contact with one another and that cell-to-cell communication through GJ channels allows for the exchange of various different molecules.

DAPI is a cationic compound that is nearly impermeable to the plasma membranes of live cells; therefore, it is typically used for staining nuclei of fixed and dead cells. However, the transfer of DAPI through GJ channels can be used to study functional coupling between living cells.^{39–41} The positive fluorescence observed in the cellular projections (figure 4A) of chondrocytes in situ cartilage suggests that chondrocytes in vivo within cartilage are functionally coupled. The results presented in figure 4B further indicate that these cells are capable of transferring small molecules of RNA. Endogenous and exogenous siRNA or mature miRNA can directly alter gene expression. Several reports have revealed the potential importance of miRNA in maintaining cartilage integrity and homeostasis.^{42–44} In fact, the major chondrogenic transcription factor Sox9 positively regulates the *COL2A1* gene in human chondrocytes by a miR-675-dependent mechanism.⁴⁵ Through the transfer of small RNAs, a small group of cells or a single chondrocyte has the potential to affect gene expression in a larger group of cells or throughout the cartilage.

GJ communication is required for physiological processes such as growth and metabolic coordination.⁴⁶ Metabolic coupling has special relevance in the case of avascular tissues such as the cornea

or lens. In these tissues, three-dimensional cellular networks and GJs are essential for the maintenance of metabolic and physiological homeostasis of the tissue, which are in turn essential for the maintenance of corneal transparency. Several congenital mutations of lens fibre cell Cxs cause various types of cataracts by affecting the conductance and/or gating of GJ channels or altering protein trafficking or channel assembly.⁴⁷ We recently reported that altered Cx protein levels and subcellular localisation are most likely associated with the development of OA.¹⁰

Cxs assemble into functional hexameric connexons in the endoplasmic reticulum membrane and pass through the Golgi apparatus to reach the plasma membrane by interacting with tubulin and actin filaments.^{48–49} The results shown in figure 3 and table 1 confirm that Cx43 interacts with the microtubules and actin filaments implicated in the shuttling of connexins throughout the cytoplasm of articular chondrocytes, to be later inserted into any site on the membrane, including cellular projections. We also detected other Cx43-interacting proteins, including ezrin and vinculin, which can affect GJ assembly.⁴⁹

Sinovial and bone cells express Cx proteins and form functional GJ channels.³⁷ Osteocytes contain multiple cellular projections and processes that, together with GJs, comprise a complex intercellular communication network implicated in matrix deposition, mechanotransduction and architecture in bone.³⁷ Cx43-expressing cells transfer molecules to other Cx43-expressing cells,¹⁵ and the deepest zone of cartilage is contiguous with the subchondral bone. Future studies should be performed to determine if the cells that form the three main tissues of the joint are capable of intercellular communication.

The establishment of cell-cell contacts that allow GJ intercellular communication is essential for the normal function of vascular and avascular tissues. Cartilage health is critical for the maintenance of mobility and quality of life in humans. The results presented herein represent a crucial contribution to our understanding of normal cartilage function and might lead to the identification of biological mechanisms underlying cartilage diseases, including the eventual degeneration of the matrix, which occurs in patients with OA.

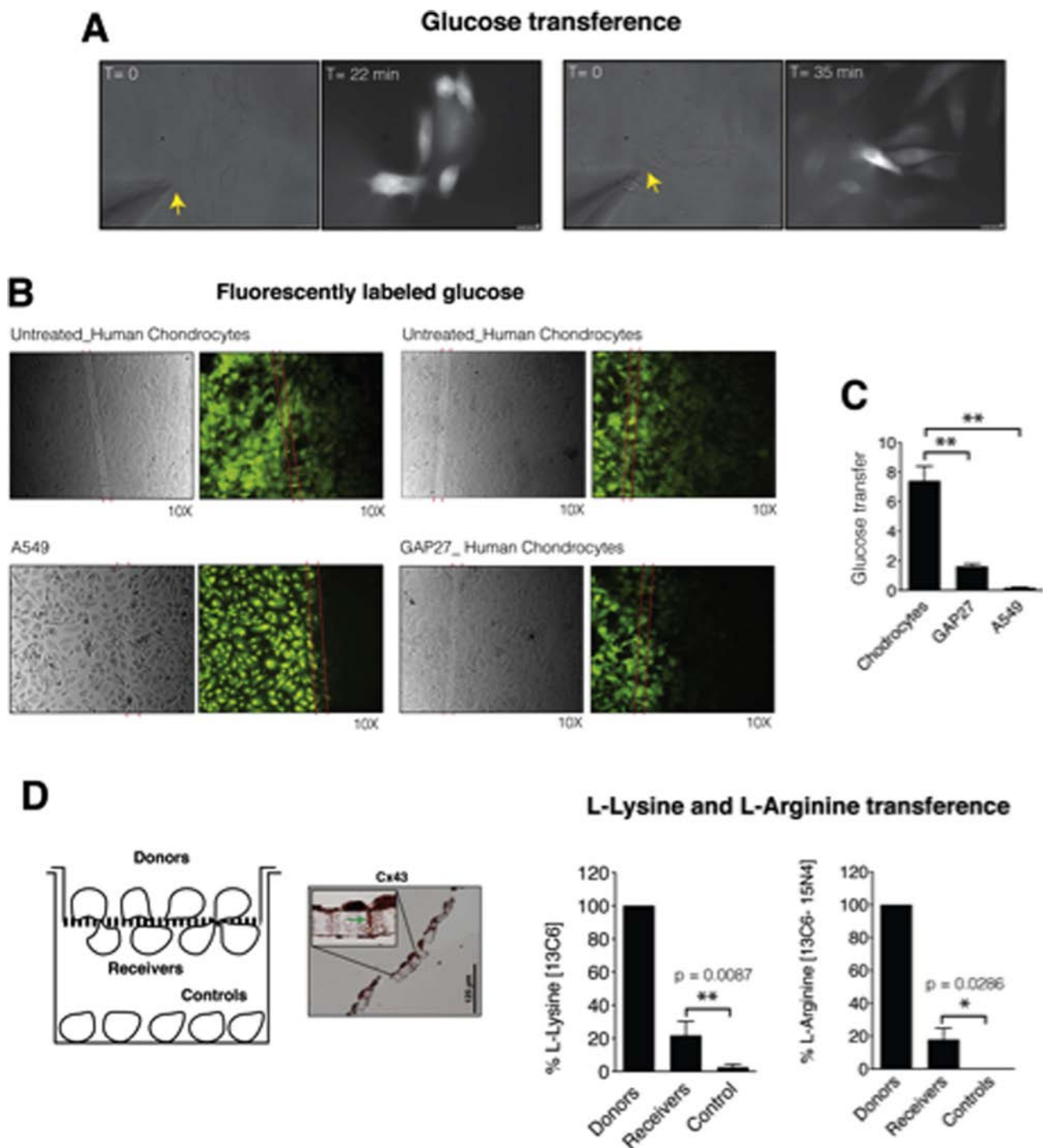


Figure 5 Direct transfer of nutrients between chondrocytes. (A) Glucose flux in contacting human chondrocytes. A pipette containing fluorescently labelled glucose was attached to a cell (yellow arrow). Glucose transference was monitored, and images were captured at 22 and 35 min after dye injection. (B) In situ electroporation on a partly conductive slide for the measurement of intercellular junctional transfer of glucose. Primary human chondrocytes or human lung carcinoma cells (line A549) were electroporated in the presence of 1 mg/mL fluorescently labelled glucose. After washing the unincorporated glucose, the cells were photographed under phase contrast or fluorescence illumination. The red lines define the conductive (left) and non-conductive sides (right). Gap junction (GJ) intercellular communication was severely reduced when cells were pretreated with 250 μ M of GAP27 for 1 h. Original magnification $\times 10$. (C) Quantification of glucose transfer through GJs. The graph represents the number of contacted cells into which the dye was transferred per electroporated border cell (score). The data are presented as mean \pm SEM. n=6; **p<0.01; Mann-Whitney test: untreated versus GAP27, and chondrocytes versus A549. (D) Transwell-layered culture system used to study the transfer of amino acids through cellular projections and GJ channels. IHC with an anti-Cx43 antibody on transwell membranes containing articular chondrocytes from adult humans. The green arrow indicates a cellular projection within the pore. The donor cells were previously cultured in labelled medium containing 73 mg/mL [$^{13}\text{C}_6$]-L-lysine and 28 mg/mL of [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$]-L-arginine and plated on top of membranes that separated the cells from the receiver cells cultured in non-labelled medium. The data are presented as mean \pm SEM. n=4 for L-arginine, and n=4 for L-lysine. **p=0.0087, *p=0.0286; Mann-Whitney test: receivers versus controls.

Table 1 Cx43-interacting proteins identified by nanoLC-MS/MS

Protein name	Accession no.	Score	Pep (95%)	% Cov
Microtubule				
Tubulin α -1A chain	Q71U36	25.68	16	55.9
Tubulin α -1B chain	P68363	27.75	17	58.8
Tubulin α -1C chain	Q98QE3	23.28	13	41.4
Tubulin β chain	P07437	27.04	19	53.8
Tubulin β 2B chain	Q98VA1	19.92	14	28.1
Tubulin β 2A chain	Q13885	24.92	17	43.4
Tubulin β 2C chain	P68371	21.86	15	47.4
Actin filaments				
α -actinin-1	P12814	12.9	9	30.5
α -actinin-4	O43707	17.34	11	27.9
Actin, cytoplasmic-1	P60709	36.68	28	70.1
Actin, cytoplasmic-2	P63261	9.88	16	57.3
Others				
Vimentin	P08670	127.22	130	99.4
Filamin-A	P21333	76.18	36	43.4
Talin-1	Q9Y490	14.17	8	29.8
Vinculin	P18206	6.16	3	24.4
Plectin	Q15149	6.68	4	25.2
Erzin	P15311	2	1	5
Myosin-9	P35579	49.81	31	55

Identification parameters used with the ProteinPilot software are provided, including the protein name and accession number according to SwissProt databases, the score, the number of peptides at 95% confidence and the percentage of protein coverage (% Cov).
MS, mass spectrometry.

In summary, the data reported here demonstrate that chondrocytes in articular cartilage form a three-dimensional cellular network mediated by GJs and provide strong evidence that such intercellular connections may be involved in the synchronised regulation of the metabolic and physiological cartilage homeostasis.

Acknowledgements The authors would like to thank Lourdes Sanjurjo and Dolores Salinas Bujan for generously providing cartilage samples after surgery; Maria Jose Sanchez Dopico and Dr Tamara Hermida for isolating articular chondrocytes from cartilage for cell culture; Dr Catalina Sueiro Lopez and Dr Ada Castro-Couceiro (SAI, UDC) for helpful suggestions and sample preparation for SEM; Dr Veronica Fernandez-Villarenaga Martin and Dr Gerardo Fernandez Martinez (SAI, UDC) for suggestions, sample preparation and data analysis (LTQ-Orbitrap); Dr Moises Blanco for the statistical advice; Dr Leda Raptis for helpful discussions and suggestions; the Translational Cancer Research Group of INIBIC for the A549 cell line; members of the proteomics group (INIBIC) for helpful technical suggestions; Christian Steinhäuser research group for advise and electrophysiology experiments on tissue; and Estefania Cives for administrative assistance.

Contributors All authors were involved in drafting or critically revising the manuscript for important intellectual content, and all authors approved the final version for publication. FJB and MDM have full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity and accuracy of the data presented. MDM and FJB are responsible for study conception and project planning. MDM, PC-F, RG-F, PF-P, PF-F, NG, VV, PRB, GSG and FJB are responsible for acquisition of data. MDM, VV, PRB, GSG and FJB are responsible for data analysis and interpretation.

Funding This work was supported in part through funding from the Fondo Investigación Sanitaria, Madrid, Spain (CIBER-CB06/01/0040; PI12/00329; RETIC-RIER-RD12/0009/0018; and Proteo-Red/ISCIII) (to FJB); Ministerio Ciencia e Innovación PLE2009-0144, FEDER (European Community) (to FJB); and the National Institutes of Health grants R01 GM088181 (to VV) and PRB-NIH R01 GM088180 (to PRB). This work was also supported through funding from a CIBBER-BNN fellowship, a predoctoral fellowship from Xunta de Galicia to RG-F and a grant from Fondo Investigación Sanitaria-Spain (CA09/00458) to PF-P. MDM is an Isidro Parga Pondal researcher (Xunta de Galicia).

Competing interests None.

Patient consent Obtained.

Ethics approval The study was conducted with the approval of the local ethics committee in Galicia, Spain.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull* 2008;87:77–95.
- Kuettner KE. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* 1992;25:155–63.
- Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* 1992;13:67–97.
- Lotz M, Loeser RF. Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone* 2012;51:241–8.
- Horton WE Jr, Bennion P, Yang L. Cellular, molecular, and matrix changes in cartilage during aging and osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006;6:379–81.
- Pitsillides AA, Beier F. Cartilage biology in osteoarthritis—lessons from developmental biology. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:654–63.
- Lotz M. Osteoarthritis year 2011 in review: biology. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20:192–6.
- Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect* 2005;54:465–80.
- Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 1998;47:487–504.
- Mayan MD, Carpintero-Fernandez P, Gago-Fuentes R, et al. Human articular chondrocytes express multiple gap junction proteins: differential expression of connexins in normal and osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol* 2013;182:1337–46.
- Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, et al. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 2003;83:1359–400.
- Saez JC, Connor JA, Spray DC, et al. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2708–12.
- Bevans CG, Kordel M, Rhee SK, et al. Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *J Biol Chem* 1998;273:2808–16.
- Alexander DB, Goldberg GS. Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. *Curr Med Chem* 2003;10:2045–58.
- Valiunas V, Polosina YY, Miller H, et al. Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. *J Physiol* 2005;568(Pt 2):459–68.
- Thomas BC, Minogue PJ, Valiunas V, et al. Cataracts are caused by alterations of a critical N-terminal positive charge in connexin50. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2549–56.
- Kanaporis G, Mese G, Valiuniene L, et al. Gap junction channels exhibit connexin-specific permeability to cyclic nucleotides. *J Gen Physiol* 2008;131:293–305.
- Gutierrez-Berzal J, Castellano E, Martin-Encabo S, et al. Characterization of p87C3G, a novel, truncated C3G isoform that is overexpressed in chronic myeloid leukemia and interacts with Bcr-Abl. *Exp Cell Res* 2006;312:938–48.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 2006;1:2856–60.
- Valiunas V, Beyer EC, Brink PR. Cardiac gap junction channels show quantitative differences in selectivity. *Circ Res* 2002;91:104–11.
- Valiunas V, Bechberger JF, Naus CC, et al. Nontransformed cells can normalize gap junctional communication with transformed cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333:174–9.
- Raptis LH, Brownell HL, Firth KL, et al. A novel technique for the study of intercellular, junctional communication: electroporation of adherent cells on a partly conductive slide. *DNA Cell Biol* 1994;13:963–75.
- Raptis L, Vultur A, Brownell HL, et al. Electroporation of adherent cells in situ for the study of signal transduction and gap junctional communication. *Methods Mol Biol* 2008;423:173–89.
- Goldberg GS, Moreno AP, Lampe PD. Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP. *J Biol Chem* 2002;277:36725–30.
- Alexander DB, Ichikawa H, Bechberger JF, et al. Normal cells control the growth of neighboring transformed cells independent of gap junctional communication and SRC activity. *Cancer Res* 2004;64:1347–58.
- Shen Y, Khushal PR, Li X, et al. SRC utilizes Cas to block gap junctional communication mediated by connexin43. *J Biol Chem* 2007;282:18914–21.
- Shen Y, Chen CS, Ichikawa H, et al. SRC induces podoplanin expression to promote cell migration. *J Biol Chem* 2010;285:9649–56.
- Holloway I, Kayser M, Lee DA, et al. Increased presence of cells with multiple elongated processes in osteoarthritic femoral head cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:17–24.
- Bush PG, Hall AC. The volume and morphology of chondrocytes within non-degenerate and degenerate human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:242–51.

Basic and translational research

- 30 Gonzalez S, Fragoso-Soriano RJ, Kouri JB. Chondrocytes interconnecting tracks and cytoplasmic projections observed within the superficial zone of normal human articular cartilage—a transmission electron microscopy, atomic force microscopy, and two-photon excitation microscopy studies. *Microsc Res Tech* 2007;70:1072–8.
- 31 Chi SS, Rattner JB, Matyas JR. Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage. *J Anat* 2004;205:363–70.
- 32 Donahue HJ, Guilak F, Vander Molen MA, *et al*. Chondrocytes isolated from mature articular cartilage retain the capacity to form functional gap junctions. *J Bone Miner Res* 1995;10:1359–64.
- 33 Knight MM, McGlashan SR, Garcia M, *et al*. Articular chondrocytes express connexin 43 hemichannels and P2 receptors—a putative mechanoreceptor complex involving the primary cilium? *J Anat* 2009;214:275–83.
- 34 Schwab W, Hofer A, Kasper M. Immunohistochemical distribution of connexin 43 in the cartilage of rats and mice. *Histochem J* 1998;30:413–19.
- 35 D'Andrea P, Vittur F. Propagation of intercellular Ca²⁺ waves in mechanically stimulated articular chondrocytes. *FEBS Lett* 1997;400:58–64.
- 36 Jones SJ, Gray C, Sakamaki H, *et al*. The incidence and size of gap junctions between the bone cells in rat calvaria. *Anat Embryol (Berl)* 1993;187:343–52.
- 37 Stains JP, Civitelli R. Gap junctions in skeletal development and function. *Biochim Biophys Acta* 2005;1719:69–81.
- 38 Dealy CN, Beyer EC, Kosher RA. Expression patterns of mRNAs for the gap junction proteins connexin43 and connexin42 suggest their involvement in chick limb morphogenesis and specification of the arterial vasculature. *Dev Dyn* 1994;199:156–67.
- 39 Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, *et al*. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 1995;129:805–17.
- 40 Nicholson BJ, Weber PA, Cao F, *et al*. The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:369–78.
- 41 Cao F, Eckert R, Elfgang C, *et al*. A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and *Xenopus* oocytes. *J Cell Sci* 1998;111(Pt 1):31–43.
- 42 Miyaki S, Asahara H. Macro view of microRNA function in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:543–52.
- 43 Goldring MB, Marcu KB. Epigenomic and microRNA-mediated regulation in cartilage development, homeostasis, and osteoarthritis. *Trends Mol Med* 2012;18:109–18.
- 44 Swingle TE, Wheeler G, Carmont V, *et al*. The expression and function of microRNAs in chondrogenesis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2012;64:1909–19.
- 45 Dudek KA, Lafont JE, Martinez-Sanchez A, *et al*. Type II collagen expression is regulated by tissue-specific miR-675 in human articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2010;285:24381–7.
- 46 Kar R, Batra N, Riquelme MA, *et al*. Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. *Arch Biochem Biophys* 2012;524:2–15.
- 47 Mathias RT, White TW, Gong X. Lens gap junctions in growth, differentiation, and homeostasis. *Physiol Rev* 2010;90:179–206.
- 48 Laird DW. The gap junction proteome and its relationship to disease. *Trends Cell Biol* 2010;20:92–101.
- 49 Giepmans BN. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res* 2004;62:233–45.



Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis

Maria D Mayan, Raquel Gago-Fuentes, Paula Carpintero-Fernandez, et al.

Ann Rheum Dis published online November 13, 2013
doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204244

Updated information and services can be found at:
<http://ard.bmj.com/content/early/2013/11/13/annrheumdis-2013-204244.full.html>

	<i>These include:</i>
Data Supplement	"Supplementary Data" http://ard.bmj.com/content/suppl/2013/11/13/annrheumdis-2013-204244.DC1.html
References	This article cites 49 articles, 17 of which can be accessed free at: http://ard.bmj.com/content/early/2013/11/13/annrheumdis-2013-204244.full.html#ref-list-1
P<P	Published online November 13, 2013 in advance of the print journal.
Email alerting service	Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Topic Collections	Articles on similar topics can be found in the following collections Clinical diagnostic tests (1012 articles) Immunology (including allergy) (3872 articles)
--------------------------	---

Advance online articles have been peer reviewed, accepted for publication, edited and typeset, but have not yet appeared in the paper journal. Advance online articles are citable and establish publication priority; they are indexed by PubMed from initial publication. Citations to Advance online articles must include the digital object identifier (DOIs) and date of initial publication.

To request permissions go to:
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:
<http://group.bmj.com/subscribe/>

Notes

Advance online articles have been peer reviewed, accepted for publication, edited and typeset, but have not yet appeared in the paper journal. Advance online articles are citable and establish publication priority; they are indexed by PubMed from initial publication. Citations to Advance online articles must include the digital object identifier (DOIs) and date of initial publication.

To request permissions go to:
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:
<http://group.bmj.com/subscribe/>

Curriculum Vitae



Paula Carpintero Fernández

Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC)
CH Universitario A Coruña, España
Telf# 34-981-176399
Fax# 34-981-176398
<http://mayan-lab.com>
<http://www.inibic.es>
Email: Paula.Carpintero.Fernández@sergas.es

FORMACIÓN POSGRADUADA:

Licenciada en Biología. Universidad de A Coruña. Junio 2011

Máster en Asistencia e Investigación Sanitaria. Universidad de A Coruña. Curso 2011-2012

Estudiante de doctorado. Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña. Universidade de A Coruña. Desde Agosto 2011

EXPERIENCIA Y ESTANCIA EN CENTROS DE INVESTIGACIÓN NACIONALES O EXTRANJEROS

AÑO	CENTRO	PERIODO
2014	Mason Laboratory & Keck Foundation, Yale University, New Haven, CT, USA	Marzo – Mayo
2011- Actualidad	Instituto de Investigación Biomédica A Coruña, INIBIC	Desde Junio 2011
2010	Instituto de Estudios Celulares y Moleculares, ICM	Julio - Agosto

PUBLICACIONES INDEXADAS. ORDEN CRONOLÓGICO DURANTE LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS.

Mayan MD*, **Carpintero-Fernandez P***, Gago-Fuentes R*, Martinez-de-Ilarduya O, Wang HZ, Valiunas V, Brink P, Blanco FJ. Articular Chondrocytes Express Multiple Gap Junction Proteins: Differential Expression of Connexins in Normal and Osteoarthritic Cartilage.

*THESE AUTHORS CONTRIBUTED EQUALLY TO THIS WORK

AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY. 2013 Feb 12. pii: S0002-9440(13)00028-X

Factor de Impacto: 5,327

Mayan M.D.*, Gago-Fuentes R.*, **Carpintero-Fernández P.***, Fernández-Puente P., Filgueira-Fernández P., Valiunas V., Brink P. Goldberg G. and Blanco F.J. Articular chondrocyte network mediated by Gap Junctions: Role in metabolic cartilage homeostasis. Correspondence to: F.J. Blanco and M.D. Mayán.

*THESE AUTHORS CONTRIBUTED EQUALLY TO THIS WORK

ANNALS OF RHEUMATIC DISEASES. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204244

Factor de Impacto: 9,11

Gago-Fuentes R.*, **Carpintero-Fernández P.***, Goldring M.B., Brink P.R, Mayan M.D. and Blanco F.J. Biochemical evidence for gap junctions and Cx43 expression in immortalized human chondrocytes cell line: a potential model in the study of cell communication in human chondrocytes. Correspondence to: F.J. Blanco and M.D. Mayán.

*THESE AUTHORS CONTRIBUTED EQUALLY TO THIS WORK

OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE. 2014 Feb 14. pii: S1063458414000417

Factor de Impacto: 4,262

PATENTES

Mayan MD, Blanco FJ, Goldberg G, **Carpintero-Fernández P**, Gago-Fuentes R. Targeting a specific receptor on cells with a specific compound for use in the treatment and/or the prevention of osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **PCT/US14/45229**

CONTRIBUCIONES A CURSOS Y CONGRESOS

Autores/as: Mayan M.D., Filgueira-Fernandez P., Gago-Fuentes R., **Carpintero-Fernández P.**, Landeira-ameijeiras V., Goyanes N., Brink P. and Blanco F.J.

Título: Long-distance physical connections between chondrocytes; Cell-to-cell signaling within hyaline cartilage

Tipo de participación: **Poster** Congreso: ***Osteoarthritis Research International (OARSI) 2011***. Lugar de la actividad: Hilton San Diego Bayfront, **San Diego (California) USA Septiembre 2011**

Autores/as: Mayan M.D., **Carpintero-Fernández P.**, Gago-Fuentes R., Filgueira-Fernández P., Valiunas V., Brink P. and Blanco F.J.

Los condrocitos articulares humanos se comunican a través de gap junctions: distribución anormal de conexinas en artrosis.

Tipo de participación: **Conferencia Invitada** Congreso: **Cell-to-Cell Communication**

Lugar de la actividad: Universidad de A Coruña, Campus de Oza, **A Coruña. Octubre 2011**

Autores/as: Mayan M.D., Gago-Fuentes R., **Carpintero-Fernández P.**, Filgueira-Fernandez P., Goyanes N., Valiunas V., Brink P. and Blanco F.J.

Título: Long-distance physical connections between chondrocytes; Cell-to-cell communication within hyaline cartilage. Tipo de participación: **Presentación oral**. Congreso: **OARSI 2012**. Lugar de la actividad: Barcelona's International Convention Centre (CCIB). **Barcelona. Abril 2012**

Autores/as: Mayan M.D., Gago-Fuentes R., **Carpintero-Fernández P.**, Filgueira-Fernández P., Hong-Zhang W., Goyanes N., Valiunas V., Brink P. and Blanco F.J. Adult human articular chondrocytes communicate through gap junction channels: abnormal connexins distribution in osteoarthritis.

Tipo de participación: **Poster**. Congreso: II Xornada de Investigación Biosanitaria IDIS 2012-05-22. Lugar de la actividad: **Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Fundación Ramón Domínguez. Abril 2012**

Autores/as: Mayan M.D., Gago-Fuentes R., **Carpintero-Fernández P.**, Filgueira-Fernández P., Hong-Zhang W., Goyanes N., Valiunas V., Brink P. and Blanco F.J. Los condrocitos articulares humanos se comunican a través de gap junctions: distribución anormal de conexinas en artrosis. Tipo de participación: **Poster**. Congreso: **Sociedad Española de Reumatología (SER) 2012**. Lugar de la actividad: **Zaragoza. Abril 2012**

Autores/as: Mayan M.D., Gago-Fuentes R., **Carpintero-Fernández P.**, Fernandez-Puente P., Filgueira-Fernandez P., Valiunas V., Brink P. Goldberg G. S. and Blanco F.J. Título: Long-distance physical connections between chondrocytes; Cell-to-cell signaling within hyaline cartilage. Tipo de participación: **Poster**. Congreso: **American College of Rheumatology (ACR) 2012**. Lugar de la actividad: **Washington D.C. (USA) Noviembre 2012**

Autores/as: Mayan M.D., **Carpintero-Fernandez P.**, Gago-Fuentes R., Fernandez-Puente P., Filgueira-Fernandez P., Goyanes N., Valiunas V., Brink P., Goldberg G. S. and Blanco F.J. Título: Articular chondrocytes are physically connected through a cellular network that is responsible of the metabolic coupling between chondrocytes located in different layers of the tissue. Tipo de participación: **Presentación oral**. Congreso: **OARSI 2013**. Lugar de la actividad: **Philadelphia (USA) Abril 2013**

Autores/as: Gago-Fuentes R., **Carpintero-Fernandez P.**, Fernandez-Puente P., Mateos J., Mayan M.D. and Blanco F.J.

Título: Proteomic analysis of connexin 43 reveals novel interactors, nuclear translocation and association with proteins dysfunctional related with osteoarthritis. Tipo de participación: **Presentación oral**. Congreso: **OARSI 2013**. Lugar de la actividad: **Philadelphia (USA) Abril 2013**

Autores/as: Mayan M.D., **Carpintero-Fernández P.**, Gago-Fuentes R. Filgueira-Fernández P., Hong-Zhang W., Goyanes N., Valiunas V., Brink P. and Blanco F.J. Articular chondrocytes network mediates metabolic coupling between distant cells embedded within the cartilage matrix. Tipo de participación: **Poster**. Congreso: **Jornadas de Investigación Sanitaria 2013-04-25**. Lugar de la actividad: **Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Fundación Ramón Domínguez. Abril 2013**

Autores/as: **Carpintero-Fernández P.**, Gago-Fuentes R, Varela-Eirin M, Goldberg GS, Mayan M.D. and Blanco FJ. Ancient chinese medicine based on a lectin (MASL), that targets glycoproteins containing alpha-2-3-sialic acid residues, decreases proinflammatory mediators production and extracellular matrix degradation response in articular cartilage. Tipo de participación: **Póster**. Congreso: **OARSI 2014**. Lugar de la actividad: **Paris, (Francia). Abril 2014**

Autores/as: **Carpintero-Fernández P**, Gago-Fuentes R, Varela-Eirin M, Goldberg GS, Mayan M.D. and Blanco FJ. Therapeutic potential of targeting sialic acid modified receptors in osteoarthritis. Tipo de participación: **Presentación oral**. Congreso: **European Molecular Biology Organization (EMBO) WORKSHOP: GLYCOBIOLOGY AND GLYCOCHEMISTRY: APPLICATIONS TO HUMAN HEALTH AND DISEASE**. Lugar de la actividad: **Lisboa, (Portugal)**. **Mayo 2014**

Autores/as: Gago-Fuentes R, Fernandez-Puente P, **Carpintero-Fernández P**, Mateos J, Mayan M.D. and Blanco FJ. Proteomic analysis of connexin 43 reveals novel interactors related to Osteoarthritis. Tipo de participación: **Póster**. Congreso: **JORNADAS INVESTIGACION BIOINTEGRA 2014 (INIBIC: IDIS: IBI VIGO)**. Lugar de la actividad: **A Coruña. Junio 2014**

Autores/as: **Carpintero-Fernández P**, Gago-Fuentes R, Varela-Eirin M, Goldberg GS, Mayan M.D. and Blanco FJ. Lectins that target sialic acid modified receptors may hold therapeutic potential for degenerative arthritis. Tipo de participación: **Póster**. Congreso: **JORNADAS INVESTIGACION BIOINTEGRA 2014 (INIBIC: IDIS: IBI VIGO)**. Lugar de la actividad: **A Coruña. Junio 2014**

Autores/as: **Carpintero-Fernández P**, Gago-Fuentes R, Varela-Eirin M, Goldberg GS, Mayan M.D. and Blanco FJ. Lectins that target sialic acid modified receptors may hold therapeutic potential for degenerative arthritis. Tipo de participación: **Póster**. Congreso: **Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) 2014**. Lugar de la actividad: **Paris. Junio 2014**

Autores/as: Gago-Fuentes R, Fernandez-Puente P, **Carpintero-Fernández P**, Mateos J, Mayan M.D. and Blanco FJ. Proteomic analysis of connexin 43 reveals novel interactors related to Osteoarthritis. Tipo de participación: **Póster**. Congreso: **ACR 2014**. Lugar de la actividad: **Boston, Massachusetts,(USA). Noviembre 2014**

Autores/as: **Carpintero-Fernández P**, Gago-Fuentes R, Varela-Eirin M, Goldberg GS, Mayan M.D. and Blanco FJ. Therapeutic potential of targeting sialic acid modified receptors in osteoarthritis. Tipo de participación: **Póster**. Congreso: **ACR 2014**. Lugar de la actividad: **Boston, Massachusetts, (USA), Noviembre 2014**

Autores/as: **Carpintero-Fernández P**, Fernández-Puente P., Gago-Fuentes R, Blanco FJ and Mayán M.D. Acoplamiento Químico y metabólico entre cartílago, hueso y membrana sinovial a través de una red de conexión celular. Tipo de participación: **Póster**. Congreso: **Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM) 2014**. Lugar de la actividad: **Santiago de Compostela. Noviembre 2014**.

Autores/as: Mayán M.D., **Carpintero-Fernández P**, Gago-Fuentes R, Varela-Eirín M., Blanco F.J and Mayán M.D. Therapeutic potential of targeting silica acid modified receptors in osteoarthritis. Tipo de participación: **Presentación oral (seminario)**. Congreso: **Gordon Research Conferences 2015**. Lugar de la actividad: **Lucca (Barga), Italia. Marzo 2015**.

Autores/as: **Carpintero-Fernández P**, Fernández-Puente P., Gago-Fuentes R, Blanco FJ and Mayán M.D. Cell-to-cell communication via gap junctions between cartilage, synovial membrane and subchondral bone: implications for joint homeostasis. Tipo de participación: **Presentación oral**. Congreso: **OARS 2015**. Lugar de la actividad: **Seattle (USA). Abril 2015**.

SEMINARIOS Y CONFERENCIAS

Autores/as: **Carpintero-Fernández P**, Gago-Fuentes R, Varela-Eirin M, Goldberg S.G., Mayán M.D., Blanco F.J. Mechanisms underlying bone joint disease illuminate pathways to novel treatments for arthritis. **Presentación oral. Conferencia invitada**. Lugar de la actividad: Rowan University, **Philadelphia (USA). Abril 2014**.

CURSOS Y WORKSHOPS

Curso de Competencias para Investigadores (GRADschool). Fundación Barrié. Lugar de la actividad: **Santiago de Compostela. Octubre 2013.**

Science Xpression Workshop. Trabajo seleccionado para **presentación oral**. Lugar de la actividad: Fundación Barrié, **A Coruña. Noviembre 2013.**

Science Xpression Seminars. Trabajo seleccionado para **presentación oral**. Lugar de la actividad: Fundación Barrié, **A Coruña. Octubre 2014.**

Happinnes at Work. Programa de desarrollo de inteligencia emocional. Universidade de A Coruña. Lugar de la actividad: Fundación Universidade de A Coruña (FUAC). **A Coruña. Diciembre 2014.**

ASISTENCIA A ACTIVIDADES RELACIONADAS CON I+D+i

Asistencia a **ProteoRed Tissue Imaging Workshop**, A Coruña. **Noviembre 2011**

Asistencia a **II Jornadas de Jóvenes Investigadores.** Workshop, A Coruña. **Diciembre 2011**

Asistencia a **VI Jornada de Terapia Celular y Medicina Regenerativa.** Workshop, A Coruña. **Octubre 2012**

Asistencia a **III Jornada de Jóvenes Investigadores.** Workshop, A Coruña. **Diciembre 2012**

Asistencia a **IV Jornada de Jóvenes Investigadores.** Workshop. Fundación Barrié. A Coruña. **Diciembre 2013**

IVI League Club of Spain. Symposium. Fundación Gabarrón. Nueva York. **Abril 2014**

Chemical-Biology Symposium. Yale University, New Haven. **Mayo 2014**

Asistencia a **V Jornada de Jóvenes Investigadores.** Workshop. Fundación Barrié. A Coruña. **Diciembre 2014**

BECAS, AYUDAS Y PREMIOS

Premio al **mejor trabajo expuesto en formato póster.** Jornadas de Investigación Sanitaria. Fundación IDIS (Santiago de Compostela). **Abril 2013**

Beca Predoctoral para Movilidad Internacional (estancia de 3 meses en la **Universidad de Yale**, New Haven, EEUU). Fundación Barrié. **Junio 2013**

Premio a la **mejor presentación oral.** Science Xpression Workshop. Fundación Barrié (A Coruña). **Noviembre 2013**

PARTICIPACIÓN EN CONTRATOS Y PROYECTOS DE I+D+i

Título: Estudio de la Función de la conexina 43 en condrocitos articulares humanos: Posible implicación en el desarrollo de la artrosis y búsqueda de una diana terapéutica.

Entidad Financiadora: SOCIEDAD ESPAÑOLA DE REUMATOLOGIA (SER)

Duración: 2013, 2 años

Calidad de participación: Investigadora Predoctoral contratada

Investigadora Principal: Dra. María D. Mayan.

Idiomas (R = regular, B = bien, C = correctamente)

Idioma	Habla	Lee	Escribe
Castellano	C	C	C
Gallego	C	C	C
Inglés*	B	C	C
Francés	R	B	R

* Ciclo Elemental do Primeiro Nivel de ensinanzas das Escolas Oficiais de Idiomas en Inglés (B1). Agosto 2005